

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504320

(43) 公表日 平成8年(1996)5月14日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 38/00	A B B		
39/395		A 9284-4C	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		9455-4C	A 6 1 K 37/02
			Z N A A
			A B B
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-508515  
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)9月24日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)3月27日  
(86) 国際出願番号 P C T / A U 9 3 / 0 0 4 9 1  
(87) 国際公開番号 W O 9 4 / 0 7 9 2 1  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)4月14日  
(31) 優先権主張番号 P L 4 9 7 3  
(32) 優先日 1992年9月25日  
(33) 優先権主張国 オーストラリア (A U)

(71) 出願人 コモンウェルス・サイエンティフィック・  
アンド・インダストリアル・リサーチ・オ  
ーガニゼーション  
オーストラリア国、エーシーティー  
2600、キャンベル、ライムストーン・アベ  
ニュー (番地なし)  
(72) 発明者 ハドソン、ピーター・ジョン  
オーストラリア国、ビクトリア州 3111、  
ドンバール、カベナ・ストリート 6  
(74) 代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的結合性ポリペプチド

(57) 【要約】

a) 安定なコアポリペプチド領域 (S C R) と ; b) 少なくとも一つの標的結合領域 (T B R) とを具備する標的結合ポリペプチドであって、前記標的結合領域は、前記 S C R に共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。該ポリペプチドは、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成し得る。本発明のポリペプチドは、製薬産業およびヘルスケア産業における診断、治療、予防または予防の分野での有用性を有し、並びに化学物質の検出および分析におけるより一般的な用途での有用性を有している。

## 【特許請求の範囲】

1. 標的結合性ポリペプチドであって、

- a) 安定なコアポリペプチド領域 (SCR) と、
- b) 少なくとも一つの標的結合領域 (TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、前記SCRに共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドであって、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成することができるポリペプチド。

3. 請求項1または2に記載のポリペプチドであって、前記SCRおよびTBRがリンカー成分によって結合されているポリペプチド。

4. 請求項1～3の何れか1項に記載のポリペプチドであって、二官能性または多官能性であるポリペプチド。

5. 請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記SCRがヒト起源であり、また血清中に存在するか若しくは細胞表面に表現されるタイプのタンパクであるポリペプチド。

6. 請求項1～5の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記TBRが、グリコホリンもしくは他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ、

ウイルス抗原、抗体もしくは他のIgGファミリーのメンバー、腫瘍増殖因子 $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )、腫瘍マーカー、細胞表面タンパクおよび白血病阻害因子 (LIF) からなる群から選択される標的に結合することができるポリペプチド。

7. 請求項1～6の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドであって、修飾抗体もしくは抗体フラグメント、scFvフラグメント、修飾CD8分子、および抗体分子もしくはそのフラグメントとCD8との組合せを含む、免疫グロブリンスーパーファミリーに対して相同性を有するポリペプチド。

8. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードする

DNA構築物。

9. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドコードするDNAを、突然変異および選別の一以上のサイクルに供して、改変された親和性、特異性または結合活性の特性をもった標的結合性ポリペプチドをコードするDNAのサブポピュレーションを得ることを具備した方法。

10. 請求項9に記載の方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードする前記DNAが、複製の能力のある要素または表現ベクター内に存在する方法。

11. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターが、バクテリオファージ、繊維状バクテリオファージ、ウイルス、バクテリア、酵母、粘菌、または哺乳類細胞からな

る群から選択される方法。

12. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターがpHFAである方法。

13. 請求項12に記載の方法であって、突然変異が大腸菌の突然変異株を用いて行なわれる方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドを製造する方法であって、

- a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、
- b) 該DNAを一以上の表現ベクターに挿入する工程と、
- c) 所望の特異性、結合活性または親和性の標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを選別することと、
- d) 改変された親和性、特異性または結合活性の特性を有する標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを得るために、前記該選別されたサブポピュレーションを、突然変異誘発および選別の一以上のサイクルに供する工程と、

- e) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現

ベクターに挿入する工程と、

f) 上記の高レベル発現ベクターを適切な発現ホスト中に導入する工程と、

g) 前記標的結合性タンパクを発現させる工程と、

h) こうして産生されたタンパクを単離する工程とを具備

した方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、薬学的に許容され得る担体とを含有する薬剤組成物。

15. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、希釈剤とを含有する診断試薬。

16. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの診断における使用。

17. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの医薬としての使用。

## 【発明の詳細な説明】

標的結合性ポリペプチド

## 〔発明の技術分野〕

本発明は、ハプテンおよび抗原に対する結合活性もしくは特異性を向上または改良した、新規ポリペプチドの構築、応用および製造に関する。

本発明はまた、表面提示抗原成分ライブラリーまたはハプテン結合成分ライブラリーの発現から誘導される抗体様の組換分子の構築、改良および選別、並びにこれらの分子の使用に関する。

本発明のポリペプチドは、製薬産業およびヘルスケア産業における診断、治療、予診または予防の分野での有用性を有し、並びに化学物質の検出および分析におけるより一般的な用途での有用性を有している。

## 〔発明の背景〕

抗体は、標的抗原またはハプテンに対する結合親和性をもったタンパク分子である。結合性相互作用の特異性によって、抗体は診断薬および治療用試薬として使用される。モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞のような純粋細胞系から誘導される。しかし、ハイブリドーマ技術は費用が高く、維持に時間を要し、また範囲が限定されている。全範囲の抗原に対して、モノクローナル抗体（適切な親和性をもった極めて少ない抗体）を生産することは不可能である。抗体遺伝子またはそのフラグメントはクローン化することができ、また大

腸菌（*E. coli*）内で生物学的に機能する形態で発現させることができる。抗体および抗体フラグメントはまた、バクテリア細胞または哺乳類細胞の何れかを用いた組換DNA技術によって製造することができる。抗体のFab領域には、二つの重鎖および軽鎖の組合せによって、分子の先端に6つの可変表面ループが与えられる。これらの外部ドメイン（Fv）に存在するループは相補性決定領域（CDRs）と呼称され、その標的抗原に対する抗体結合特異性を与える。この結合作用は抗体分子の可変ドメインに局在しており、該ドメインは重鎖および軽鎖の両方のアミノ末端に位置している。これは図1に示されている。幾つかの抗体における可変領域は、本来の抗体分子からタンパク加水分解によって切断さ

れた後でさえも、非共有結合的に会合した状態 ( $V_H V_L$  ダイマー、 $F_v$  領域と称する) で残り、その抗原認識能および結合能の大半を保持している。定常領域が実質的に存在しない二本鎖  $F_v$  を製造する方法は、米国特許第4,642,334号に開示されている。

組換  $F_v$  断片は解離し易い。従って、幾人かの研究者等は2つのドメインを共有結合させて、 $s c F_v$  と称する構築物を形成することを選択した。該  $s c F_v$  においては、結合ドメインを有する2つのペプチド (通常は抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域) が、抗原結合ドメインの相対的位置関係が元の抗体で見られる位置関係と一致するように、一方のドメインのC末端を他方のN末端に結びつけるリンカーペプチドによって結合されている (図1参照)。

米国特許第4,946,778および同第5,132,405号には、共有結合的に結合された  $F_v$  断片の製造方法が開示されている。更に、二官能性試薬 (bifunctional agents) および多官能性試薬 (multifunctional agents) の製造によって、異種混合 (heterogeneity) が達成される (ヒューストン等の米国特許第5,091,513号およびランダー等による米国特許第4,816,397号)。

$s c F_v$  ライブラリーの構築は、例えば欧州特許出願第239400号および米国特許第4,946,778号に開示されている。しかし、 $s c F_v$  をのコードする単一のDNA分子のクローニングに内在する問題のために、単鎖  $F_v$  ライブラリーは大きさに制限をうける。 $V_H$  または  $F_{ab}$  ライブラリーのような非  $s c F_v$  ライブラリーも公知であり (Ladner 及び Guterman W090/02809) あり、これは表面発現用のファージ系と共に使用される (Ladner et al., W088/06630 及び Bonnert et al., W092/01047)。

抗体治療に使用する場合、モノクローナル抗体 (通常はマウス由来) はヒトに投与すると抗原性反応を引き起こすので、先ず「ヒト化」されない限りは使用が制限される。抗体の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する6つの超可変領域 ( $CDR_s$ ) を有する  $\beta$  シート構造のフレームワークからなっている。ヒト化は、結合親和性を与えるマウスの配列、特に  $CDR$  ループ配列を、ヒト可変ドメイン構造内に置換することからなっている。従って、該マウスの  $CDR$  ループ領域

は所望の抗原に対する結合親和性を与える。CDR s の移植

による組換抗体のヒト化は、Winter et al (EP-239400) に開示されている。

発現／組合せシステムを用いて多様な組換ヒト抗体を発現させることが、Marks et al, J. Mol. Biol. 1991 222, 581-597に記載されている。繊維状ファージの表面にペプチドおよびタンパクを発現させる方法における最近の新事実 (McCafferty et al, Nature 1991 348 552; Clackson et al, J. Mol. Biol., 1991 352 624-28) は、診断および治療法としてこれら試薬を選択し、改良し及び開発する能力を提供している。マウスおよびヒトの両方に起源をもつクローン化された重鎖および軽鎖遺伝子の発現、提示および対合を行なうための改良されたバクテリオファージゲノムを使用することが、Hoogenboom et al. Nucl. Acids Res., 19 4133-4137; Marks et al. 1991 op. cit. 及びBonnert et al, WPI Acc. No. 92-056862/07に記載されている。

受容体分子（その発現は、該受容体をコードする遺伝子ライブラリーが発現生物体中で発現した結果である）もまた、同じ方法で表現され得る (Lerner and Scorge, W090/14430)。細胞表面タンパクと融合した単鎖抗体ドメインの細胞表面での発現については、Ladner et al W0/06630に開示されている。

親和性の成熟は、抗体の結合特異性、親和性または結合活性が改変される過程である。様々な実験技術が工夫されており、抗体フラグメントの全体またはCDR s 等の選択された領域の何れかに、種々の突然変異ストラテジーを適用するこ

とによって、多様なアミノ酸配列が創造される。酵素の特異的活性を変化させる突然変異についても報告されている。当業者は、ランダム突然変異または部位指向性突然変異を達成するため、並びに所望の修飾を施された分子を選択するための、種々の方法を知るであろう。所謂「チェインシャッフリング (chain shuffling)」技術、即ち、固定された相補的鎖（例えば軽鎖）について一つの鎖タイプ（例えば重鎖）のライブラリーの再組合せを行なうことによって、多様性を高め且つ特異的な抗体を選択する機構については、Kang et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991 88 4363-466; Hoogenboom et al, Nucl. Acid Res., 1991 19

4133-4137; Marks et al, Bio/Technology, 1992 10 779-783に記載されている。

抗体のVドメイン、フレームワークまたは定常領域の何れかの部分のマウス配列に対して、ヒトが反応する問題を克服するために、末梢血リンパ球を含む種々のヒト組織から、組換えヒト抗体遺伝子ライブラリーを構築することができる (WinterおよびMilstein Nature, 1991 349 293)。ヒト成人は既に抗原性刺激を受けているので、広範囲の抗原を認識する予め免疫感作された成人B細胞集団の能力は、生来のB細胞集団と比較して減少し、また抗体のmRNA分子の制限された集団に反映される。

従って、できる限り広い抗原結合能を得るために選択される組織の一つは胎児末梢血である。この退治末梢血は生れた状態のままであり、IgM抗体分子の比率が大人の血液よ

りも高い (約70%; なおIgGは30%)。従って、種々様々な抗原を結合できるように広範な成熟 (進化) を予定した抗体ライブラリーを構築するための、理想的な遺伝子材料の供給源を提供する。

#### [発明の概要]

従って、本発明の範囲内には下記の事項が含まれる。

- 1) 標的に対して結合する新規な組換えポリペプチドの同定および構築。
- 2) このようなポリペプチド剤を、例えばそのDNAコード領域の突然変異を含む機構によって改変し、その性能を変えること。
- 3) 更に、サブコンポーネントの再組合わせにより、遺伝子レベルまたはタンパクレベルの何れかにおいて、これらのポリペプチド剤を変化させること。

第一の側面に従えば、本発明は、標的結合性ポリペプチドであって、

- a) 安定なコアポリペプチド領域 (SCR) と、
- b) 少なくとも一つの標的結合領域 (TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを経ているポリペプチドを提供する。



我々は、結合の特異性、親和性または結合活性が改変された本発明によるポリペプチドを、成熟工程の実施を必要とす

ることなく、設計および構築することができた。これは、例えば免疫グロブリン(Ig)およびCD8を用いて行なわれた。

我々は、TBRがSCRに共有結合している一価の標的結合性ポリペプチドの構築を開示する。該SCRは、好ましくは、Igスーパーファミリーの共有結合した二つのIg様ドメイン(例えば抗体可変部ドメインまたはCD8ドメイン)の結合によって形成される。

我々はまた、分離または重複したTBRsをSCR上に形成することによって、多官能の標的結合性ポリペプチドが如何にして製造され得るかを示す。我々はまた、IgスーパーファミリーのメンバーのIg様ドメインをSCRsとして構築することができ、また非共有結合的に結合して二官能性および多官能性の標的結合性ポリペプチドを製造できることを示した。我々は、Ig様ドメインに共有結合することができ、それにより自己会合して好ましくは二官能性または多官能性の特異性を有する安定なダイマー、集合体またはアレイを形成するアミノ酸配列を、如何にしてデザインするかを開示する

標的結合性領域は標的分子に結合することができ、該標的分子は何れのタイプの化学物質でもよい。例えば、該標的は殺虫剤または薬物等の小分子、ステロイド等のホルモン、アミノ酸、ペプチドまたはポリペプチド；細菌性、ウイルス性、または細胞表面抗原等の抗原；抗体またはIgスーパーファミリーの他のメンバー；腫瘍マーカー、増殖因子等であり得

る。当業者は、容易に種々様々な目的の標的を選択することができるであろう。

本発明のポリペプチドが、イン・ビトロでの診断目的に使用される場合、コアポリペプチド領域は、適切なタンパクなら何でも良い。しかし、本発明のポリペプチドをイン・ビボを使用することを意図する場合には、該コアポリペプチド領域は非抗原性であることが好ましい。従って、血清中に存在し或いは細胞表面に出現する、一般に耐性のあるタイプの通常のヒトタンパクなら何れも適するであろう

う。通常の細胞表面タンパクの一定のドメインは可溶型で産生され、また本発明の方法によって、その親和性を向上または改変することができる。T細胞表面タンパクを本来の標的とするヒトタンパクの場合、その可溶性フラグメントは、特に移植に有用な有望な免疫調節治療試剤になる。これらフラグメントの多くは、イムノグロブリンのスーパーファミリーのタンパクとの相同性を有するであろう。

本発明の特に好ましい態様においては、標的は、グリコホリン (glycophorin) または他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ；B型肝炎抗原、HIVのgp40タンパク等のウイルス抗原；腫瘍マーカー、CD28およびCD4等の細胞表面タンパク；腫瘍増殖因子 $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )、白血病阻害因子 (LIF) からなる群より選択される。診断および治療の何れの応用においても、標的結合領域が二以上の特異性をもっていれば特に有用である。標的結合ポリペプチドが、二以上の標的との親和性をもって

いることが特に好ましい。この親和性は、表面を分離し又は重複させて、二官能性または多官能性試薬を形成することによって提供される。二作用性または多作用性の試薬もまた、任意にリンカーポリペプチドを使用して、個々の標的結合性ポリペプチドを共有結合または非共有結合させることによって作成されと思われる。

第二の側面において、本発明は、上記の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を提供する。

第三の側面において、本発明は、本発明の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、突然変異および選別からなる1以上のサイクルに供して、親和性、特異性または結合活性の特徴が改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNA分子のサブ集団を得ることを具備した方法を提供する。

好ましくは、標的結合性ポリペプチドをコードするDNAは、複製能力のある要素または表現ベクター (display vector)、即ち、適切なホスト中で自己複製するベクターの中に存在することが好ましい。該表現ベクターは、好ましくはバ

クテリオファージ、F d等の繊維状バクテリオファージ、ウイルス、細菌、酵母、粘菌、または哺乳類動物細胞からなる群から選択される。

突然変異誘発は、ランダムまたは部位指向的の何れであってもよく、当業者はこの工程を行なうために適した多くの方法を知ってであろう。標的結合性ポリペプチドの一以上の標

的結合領域が、突然変異に供される。

本発明に用いられる好ましい突然変異系では、mut Dおよびmut T1と命名された大腸菌の特殊な突然変異株を利用する(R. Fowler et al, J. Bacteriol., 1986 167:130)。これら特別の突然変異株はファージでトランスフェクトでき、本発明の目的に特に有用である。

好ましい態様において、上記の標的結合性ポリペプチドを製造する方法は、

- a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、
- b) 標的結合性ポリペプチドの一以上の標的結合領域に突然変異を誘発するために、該DNAを任意に突然変異誘発に供する工程と、
- c) 該DNAを、一以上の表現ベクターに挿入する工程と、
- d) 所望の特異性、結合活性または親和性をもった標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブ集団を選別する工程と、
- e) 該選別されたサブ集団を、親和性、特異性または結合活性の特徴が改変された標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブ集団を得るために、突然変異誘発および選別からなる1以上のサイクルに供する工程と、
- f) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現ベクターに挿入する工程とを具備する。

表現ベクターのサブ集団の選択は、標的結合、蛍光活性化

細胞選別、又はビオチン・アビジン若しくはビオチン・ストレプトアビジン系の利用等のような、種々の従来法によって達成される。特に好ましい方法は、免疫チューブ等の不溶性支持体上で行なう親和性選択である。これは特に簡便である

ことが分かった。

従って、本発明はまた、上記記載の高度の発現ベクターを適当な発現ホスト中に移入し、標的結合ポリペプチドを発現させ、こうして産生されたタンパクを単離することによって、標的結合性ポリペプチドを製造する方法をも提供することが理解されるであろう。

また、標的結合性領域および安定なコアポリペプチドは、同一分子の異なる領域であってもよく、または異なる分子から誘導されてもよいことが明瞭に理解されるであろう。

本発明によって観念される標的結合性ポリペプチド構築物のタイプには、改変された抗体または抗体フラグメント、連続的な際組合せを可能にする会合リンクを含んだ s c F v フラグメント、改変 CD 8 分子（例えば、単鎖 CD 8）、および抗体分子またはそのフラグメントと CD 8 または免疫グロブリン・スーパーファミリーに関連する他の分子（MHC クラス I および I I 分子のこのドメイン等）との組合せが含まれる。例えば、MHC クラス I の  $\alpha 3$  ドメインは CD 8 と結合し、従って  $\alpha 3$  の可溶性バージョンは有力な免疫調節剤になる。CD 8 を利用する好ましい構築物には下記のものが含まれる。

a)  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットの V 様ドメインのみが連結さ

れている単鎖分子。

b) シグナルペプチドの電荷バランスを変更して、生物学的活性に悪影響を与えずにバクテリアでの発現を可能にするために、N 末端アミノ酸をリジンからセリンに変えた分子。

標的結合性ポリペプチドは、共有結合したポリペプチド尾部を含むことができ、該尾部は T B R s であってもよく、或いは他の T B R s と非共有結合的に会合していてもよい。

以下の記載は、特に I g G タイプの抗体およびそのフラグメントに関する幾つかの例に言及しているが、本発明は他のタイプ（I g M および I g A 等）の抗体にも応用可能であることは明確に理解されるであろう。

標的結合性ポリペプチドをコードする DNA 配列は、該ポリペプチドをバクテ

リアファージまたは細胞表面に表現できる何れのベクターにもクローン化できる。好ましいベクターはpHFAであり、その構築物は国際特許出願第PCT/AU93/00228に記載されており、その構造は図4に示されている。タンパクの発現に好ましい細菌ホストは、大腸菌 (E. coli) およびバチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) である。

〔図面の詳細な説明〕

以下の限定的でない実施例および図面を参照して、本発明を詳細に説明する。

図1は、抗体およびそのフラグメントの構造を例示している。

(a) これは、二つの同じ重鎖および二つの同じ軽鎖からなり、重鎖および軽鎖の夫々が可変ドメイン (V) と定常ドメイン (C) とに分かれている、典型的なIgG抗体のポリペプチド鎖構造を示している。全体のIgG分子は、Fv領域の末端に二つの同一の抗原結合表面を有しており、これら抗原結合表面はV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖の対合によって形成される。このV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>の組合せによって、相補性決定領域 (CDRs) と称する6個のループが分子の先端に提供され、これらループは抗原結合表面を提供することによって、その標的抗原に対する抗体の結合特異性を与える。

(b) Fab抗体フラグメントは、一つの軽鎖および一つの重鎖の一部を含んでいる。

(c) FabフラグメントおよびFvフラグメントの両者は、何れも親抗体と同じ抗原結合表面を有していると思われる。

図2は、繊維状fdバクテリオファージの表面に、該ファージ先端の副次的コートタンパク (遺伝子IIIタンパク) に対する共有結合的な融合によって、或いは主要な遺伝子VIIIコートタンパクとの融合として表現された、Fab分子およびscFv分子のような抗体フラグメントを示している。Fab

分子の表現については、一方の鎖 (重鎖又は軽鎖) のみがファージのコートタンパクにアンカーされ、他方の鎖は可溶形で宿主細胞の周辺細胞質中に可溶性の形で与えられる。遺伝子IIIタンパク上での融合によって宿主細胞への感染性

が低下しているが、このF dバクテリオファージは未だ生存可能である。

図3は、重鎖領域および軽鎖可変領域のプール（ライブラリー）が、一方の鎖をファージの遺伝子IIIタンパクまたは遺伝子VIIIタンパクに融合させて、F dファージ表現ベクター中に構築される方法を示している。この表現ベクターは宿主細胞中にトランスフェクトされて、二重組合せライブラリーを生成する。夫々の宿主細胞は、抗体フラグメントがファージ表面に表現される生存可能なF dファージを製造し、また抗体をコードする遺伝子はウイルスゲノムと共にパッケージされる。ファージのアフィニティー精製は標的抗原に対する親和性に基づいており、抗体をコードする遺伝子の生存ファージからの同時回収を可能にする。ファジミド表現ベクターは形質転換効率を改善することができるが、生存可能な子孫を組み立てるためのヘルパーファージを必要とする。別の戦略には階層的ライブラリーの構築が含まれるが、ここでは一定に維持された一方の鎖が第二の鎖のライブラリーと共に表現され、親和性の最も高い対合鎖が選別される。別の表現ベクター上の遺伝子プールを用いてより複雑なライブラリーを構築することができ、次いで該ライブラリーは宿主細胞に交差トランスフェクトされる。遺伝子の回収は、

この二つのベクターの相対的なパッキング効率に依存するであろう。

図4は、ファジミドベクターHFAの構造を示している。該ベクターは、大腸菌（*E. coli*）の抑制株において、F dファージ表面の遺伝子IIIタンパクと融合されたクローン化抗体を発現する能力を有する一方、非抑制株においては、該クローン化抗体遺伝子は可溶性生成物として発現される。lacZプロモータは、IPTGでの発現の誘導を可能とし、またFLAG（抗体との融合体として発現される）は合成の検出およびアフィニティー精製のために用いられる。

図5は、一連のscFV・NC10欠損リンカー構築物と、ポリペプチドリンカーによって連結される理論的な最小距離（オングストローム）とを示している。

図6は、適切に制限分解されたpPOW-scFV・NC10の中に挿入された、長さが異なるポリペプチドリンカーをコードする合成オリゴヌクレオチド二

重鎖のDNA配列を示している。

図7は、 $V_H \cdot 15 \cdot V_L$ 、 $V_H \cdot 10 \cdot V_L$ 、 $V_H \cdot 5 \cdot V_L$ および $V_H \cdot V_L$ から合成されたs c FV・NC10タンパクの分析を示している。図の写真は、クーマシーゲル（上部パネル）上での非誘導型（レーン1～4）および誘導型（レーン5～8）の分析結果と、抗FLAG、M2抗体（IBI社、New Haven、CT）でプローブされ、続いて第二抗体としてのヤギ抗マウス抗体・西洋ワサビペーオキシダーゼ複合体（シグマ社）で処理され、更に増強化学発光（ア

マーシャム社）によって検出された該クーマシーゲルのウエスタンブロットの分析結果（レーン9～16下部パネル）である。

図8は、観察されたs c FV・NC10の会合度と、その標的抗原に対する活性の要約である。

図9は、抗体Fvフラグメントと、CD8 $\alpha$ 鎖ヘテロ二量体との間の構造の同一性を示している。

(a) これは、1～6の番号を付したCDRループおよび構造的に保存されたフレームワーク領域（リボン）を示す、 $V_H$ または $V_L$ 分子のリボン図である。

(b) これは、二つのCD8 $\alpha$ 鎖のリボン図である。抗体CDRループに対応する領域は分子の頂部に示され、番号が付されている。

このホモ二量体は、紙面に垂直位置する分子対軸をもって配向されている。分子の頂面からのCVR様ループが示されており、CDR1様ループ、CDR2様ループおよびCDR3様ループには、一方のサブユニットについては夫々1, 2および3の番号を付し、他方のサブユニットについては夫々1', 2'および3'の番号を付してある。C末端は分子の底部から延出している。二量体界面を形成するループは、CDR3様ループ（頂部）およびC-C'ループ（底部）である。

図10は、p POWを用いて大腸菌宿主細胞p o p 2136中で合成されたs c CD8の、全細胞様怪物を示すクーマシーで染色したSDS-PAGEゲルを示している。矢印は、

融合および成熟（開裂したシグナル配列）s c CD8の位置を示している。この図において、

レーン1：p POW-s c CD8を含む非誘導細胞

レーン2：p POW-s c CD8の4時間の後インキュベーション

レーン3：p POW-Lys→Ser・s c CD8を含む非誘導細胞

レーン4：p POW-Lys→Ser・s c CD8の4

時間の後インキュベーション

レーン5：前染色された分子量マーカーである。

図11は、個々の抗体遺伝子がアフィニティー成熟され得るスキームを示している。個々の遺伝子はファージ表現ライブラリーから選別され、次いで数ラウンドのイン・ビボ突然変異またはイン・ビトロ突然変異を受ける。アフィニティー成熟した抗体フラグメントは、次いで、更なる突然変異ラウンドまたは高レベル遺伝子発現に先立って、抗原に結合する能力について選別される。全体の抗体ライブラリーは、パンニングまたはアフィニティー選別による個々のファージの選別に先立って、突然変異ラウンドを繰り返すことにより、その複合度を増大させることができる。

図12は、アフィニティー突然変異のための突然変異を受けたコロニーの、ELISAスクリーニングの結果を示している。

図13は、p569ベクター（W. Nellen氏からの供与）、

即ち、D. ディスコイデウム（D. discoideum）内での発現のためのシャトルベクターの一例を示している。このベクターは、アルファLフコシダーゼプロモータ配列、シグナル配列、マルチクローニング部位、翻訳ターミネータおよびG418による選別のためのトランスポゾンTn903を有している。

図14は、X線回折分析によって3オングストロームの解像度で解析された、二つのインフルエンザノイラミニダーゼ・サブユニットと複合されたNC10・s c Fvフラグメントのポリペプチド骨格として描かれた三次元構造を示している。この図では、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を連結しているリンカーポリペプチドは描かれていない。この結晶構造においては、二つのFvフラグメント



が背面-背面で会合して、二つの異なるノイラミニダーゼサブユニットを二量体化している。このs c F vフラグメントの状況において、該二量体F v分子は二官能性試薬とみなされる。

図15は、溶液中において電子顕微鏡によって解析された、四つのNC10・s c F v二量体によって一緒に結合された二つのノイラミニダーゼ四量体のモデルを示している。

図16は、背面-背面で二量体化され、立体障害なしに密接に会合された二官能性F v分子のモデルを示している。このモデルにおいて、重鎖のC末端は、残りのポリペプチド骨格の最小限の再構成を伴って、軽鎖可変領域の-13残基に直接に連結され得る。

図17は、非共有結合的および共有結合的に夫々連結されたs c F v二量体を模式的に示している。

配列認識番号1は、バクテリアでの発現のためにデザインされたマウスLy-2・Ly-3Vドメインの一例を示している。

配列認識番号2は、p POWのようなバクテリア分泌型ベクター中での発現のためにデザインされた、ヒト単鎖CD8構築物の一例を示している。

配列認識番号3は、発現のためにデザインされたマウスMHC a 3ドメインの一例を示している。

配列認識番号4は、p HFAにおけるリンカーを含まない1 C 3・s c F vのDNA配列を示している。

配列認識番号5は、p e l B分泌シグナルおよびFLAG・C末端ペプチドを伴った、抗インフルエンザNC10・s c F vのDNA配列を示している。

配列認識番号6は、PCR増幅後のp 569への連結のために準備されたp HFAにおける抗グリコホリン1 C 3 F a bの最初の1443塩基のDNA配列を示している。

本発明の好ましい態様には、次のものが含まれる。

1. 標的結合性ポリペプチドの構造は、抗原に対する接触領域（従って特異性）を提供する表面ポリペプチドの6個のループによって一つのTBRが形成され

るような、s c F v分子に基づき得る。特に好ましい態様においては、抗原に接触して十分な接触面積および親和性を与えるために、T B Rは4個のC D Rループによって形成され得る(図14)。N C 1 0を用いた我々の結果は、これらポリペプチド配列をランダムに突然変異して標的親和性を修飾することが容易であることを示している。

2. 二官能性または多官能性の抗体試薬は、個々の標的結合性ポリペプチドを共有結合的に連結することによって製造することができる。この共有結合的結合は、単鎖F v分子の形のポリペプチド鎖によって提供され得る。二量体化または凝集し易い傾向をもった個々のタンパク、領域を結合することによって、特異性を組合せることができる。従って、例えば、追加のポリペプチド鎖によって、二つの単鎖F vフラグメントをその正常な向きで連結することは必要とされない。これは、異なった特異性の重鎖と軽鎖、重鎖と重鎖、または軽鎖と軽鎖を連結し、次いで機能的な二量体または凝集体を形成することによって達成することができる。勿論、この方法はまた、必要な特異性をもったVドメインを、C D 8、T細胞受容体フラグメントまたはM H Cフラグメントから誘導された免疫グロブリン様ドメインと連結するためにも用いることができる。

好ましい態様において、抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のような二つのI g様ドメインの共有結合的な連結は、リンカーポリペプチドを用いて、または用いることなく行なうことができる。単量体s c F vフラグメントの場合、ポリペプチドリンカーは、s c F v結合部位の原形を損なうことなく、一方の可変(V)ドメインのカルボキシ末端と他方のVドメインのアミノ末端との間で、V<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを共有結合的に連結する。s c F vは、V<sub>H</sub>・リンカー・V<sub>L</sub>融合タンパクの、若しくはV<sub>L</sub>・リンカー・V<sub>H</sub>

融合タンパクの何れかのドメイン順序で組み立てられ得る。このリンカーは、疎水性のVドメイン表面との会合を防止するために、好ましくは親水性でなければならない。リンカーは、経験的な選別によって確立された好ましい大きさをもった25アミノ酸残基よりも小さい長さであり得る。好ましいリンカー配列は5量

体ユニットのGly4Serからなり、ここでセリン残基はペプチド骨格の親水性を高める一方、グリシン残基は、Vドメンの回りに或る範囲のコンホメーションを取るために十分な可撓性をリンカーに与える。特に好ましい態様において、ポリマーFvフラグメントの共有結合性の会合体は、連結配列において一つのIgドメインの切片を除去することによって、追加のリンカーポリペプチドなしで製造することができる。これらのリンカー無しの構築物は、ここでは緊密に結合されたドメイン (tightly coupled domains ; TCDs) と称する。除去すべきアミノ酸の数は経験的に、或いはタンパク設計理論を用いて決定することができる。図16は、二つのFv分子が背面-背面で会合したTCDsを描写しており、ここでは二つのTBRsが分子の反対端にあり、二つの標的分子に交差結合することができる二官能性試薬を形成している。この例においては、密接な会合を得るために、好ましくは13アミノ酸までが除去される。得られた分子は、近接してはいるがIg様ドメイン間の相互作用が立体的に阻害されないような形で、少なくとも二量体にまでオリゴマー化する傾向を有している。遊離のアミノ末端およびカルボキシ末端にポリペプチド尾部を付加することに

よって、分子上のTBRsの数を増加できると思われる。また、Ig様ドメインの結合部で除去された欠失ポリペプチド配列が、Ig様ドメインにおける他の位置に結合したポリペプチド配列を与えることによって、全体的または部分的に置換され得ることは明らかである。我々は、これら分子が二次元アレイを形成し、それによって二官能性表面を提供することができるであろうと予期して。これらのアレイは、生物学的なコーティング手段としての特異的な用途を有するであろうと思われる。

ヘテロ二量体的な $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖を含む、成熟したヒト若しくはマウスCD8の完全な三次元構造は未だ知られていない。ヘテロ二量体ヒトCD8 $\alpha$ の結晶構造からの予測は、 $\alpha$ 鎖がトポロジーにおいて抗体VL鎖と類似していることを示唆している (Leahy et al., Cell, 1992, 68, 1145-1162)。我々は、バクテリア選別バクターを用いた発現のために、マウスCD8 $\alpha/\beta$ ヘテロ二量体の単鎖変種を構築したが、ヒトCD8を用いても同様の結果が期待され得る。本来のヒ

ト若しくはマウスのCD8分子は、MHCクラスIの分子にのみ親和性を有すると思われる。我々は、実施例に記載したようなランダムライブラリーのアプローチによって、scCD8分子を、標的結合性ポリペプチドを製造するための安定なフレームワークとして用いることが可能になるであろうことを予測した。この方法によって、scCD8分子を疑似抗体として使用することができる。更に、このscCD8分子は、接触表面に6個未満のCDRループのためのフレームワーク

を提供するために、大きさ及びCDRと等価なループ構造を更に修飾することができる。特に好ましい態様において、我々は、接触領域に4個または5個のCDRループを提供できる安定なタンパクフレームワークを企画している。我々はまた、他のIgドメインに適用するための戦略を企画している。例えば、MHCクラスIおよびIIの免疫グロブリン様ドメインを可溶性の形で発現させることができ、これを修飾すれば免疫調節剤として使用することができる。

4. 標的結合性ポリペプチドに対する上記のような修飾は、図3に示したようなライブラリー選別および修飾戦略を用いることによる、コーディング領域の突然変異に基づくことができる。この突然変異は、低親和性で且つ特異性の広い単鎖TBPまたはTBPを成熟させ、それが認識する標的分子の範囲を高める。より重要なことは、ライブラリーの各メンバーについての結合親和性の範囲を作成し、その個々のDNAコーディング領域が公知の方法論によって容易に選別され、単離され得ることである。このようなライブラリーは、抗体様フラグメントに対して親和性を示し、或いはリガンド、他のタンパク、酵素若しくは受容体に対して親和性を示す何れか別のペプチドを含むであろうことが想定される。また、それ自身は抗原性ではないが、組換えDNA技術によってコーディング領域を移植することにより、特定のリガンドに対する親和性をもったCDRループまたはペプチドを付加することによって修飾され得る安定なコアポリペプチドをも含み得る。また、フレームワーク領域に対する変化によっ

て、タンパクのコンホメーションの変化がもたらされ、親分子とは異なった結合

特性をもった変化した結合表面が提示されることも見られる。

最も平凡な例には、所定の標的結合特性をもった組換え抗体フラグメント（単鎖Fvフラグメントを含む）を製造する発現ライブラリーの構築が含まれる。図3に示した夫々の選別工程に引き続き、結合ドメイン（好ましい例ではV<sub>H</sub>ドメインおよびV<sub>L</sub>ドメインを含む）の継続的な再組合せを可能にする表現ベクターは、例えばpHFAのために適切に使用することができる。

5. 本発明は、広範囲の受容体、受容体様分子、並びに結合活性、構造的一体性および生物学的活性の何れにとっても潜在的に重要な領域における突然変異を伴って構築された分子を構築し、選別するために使用され得る。発現した後の初期のファージ表面での表現、および大腸菌からのファージ救出は、このアプローチの有効性をモニターするために用いられるが、真核細胞系のような他のシステムも発現能力を有している。酵母（サッカロマイセス・セレビシエ）は、 $\alpha$ 交配因子プロモータの制御下において、NC41のV<sub>H</sub>、即ちインフルエンザウイルスのスノイラミニダーゼに対するモノクローナル抗体を発現することが示されており、また粘菌のディクチオステリウム・ディスコイデウム (*dictyostelium discoideum*) はNC10のV<sub>H</sub>およびscFvの両方を含む組換えタンパクを発現することができる。

#### 6. 特定の抗原（LIF、TGF- $\alpha$ 、グリコホリン、細

胞表面マーカーまたは他の細胞特異的表面タンパクが含まれ得る）に結合することができる標的結合性ポリペプチドの特異的な選別は、表現ベクター上での表現、例えば遺伝子III生成物に融合したこれらペプチドのファージ表面での表現の結果として可能になる。適切なファージを選択することによって、これらは次に、図5に示したように突然変異のラウンドに供される。

以下の実施例においては、分子の全体に亘ってランダムニ突然変異を誘発するために、大腸菌のmutDおよびmutT1変異株が用いられる。これは、文献に見られる何れかの標準的な技術を用いることにより、これらの大腸菌株をプラスミドDNAで形質転換することによって行なわれる。好ましい方法は電気穿孔法である。或いは、標準的なトランスフェクション法によって、組換えファージ

を変異株にトランスフェクトしてもよい。これらのプラスミド／ファージを含む大腸菌の増殖ランドを行なった後、ファージは、ヘルパーファージを用いた標準的な技術によって救出され得る。次いで、結合親和性に対する種々の突然変異の影響を測定するための、抗原結合試験に用いることができる。

これらの突然変異は、DNAにおける塩基置換を起こすことは確認されていないけれども、分子における結合領域の数、大きさおよび位置が変わるような、分子の構造に対するペプチドの付加も含まれ得る。これらの付加を伴う単一のドメイン結合ユニットは、特異的でないとすれば、親和性が実質的に変化した結合特性を示すであろう。特定の部位における

突然変異と結合親和性との間の相関は、治療的および診断的に有力な標的結合性ポリペプチドのための、新しいCDRループおよびフレームワーク領域をデザインするために用いることができる。

本発明の範囲にはまた、「抗体遺伝子」の制御された発現に向かうプロセスの第一ステップの原因でとなる抗原または何らかのリガンドの直接の制御下での、組換え細胞からの組換えタンパクの発現も包含される。

7. 二官能性または多官能性試薬は、上記のライブラリー技術を用いて選別することができる。標的結合性ポリペプチドは、ポリペプチド尾部を介しての結合によるアフィニティー選別のために表現され得る。二以上の異なった標的抗原もしくはハプテンに対する親和性に基づく選別は、同じ分子の異なった位置に二つの結合表面を有する単一の分子を選別するであろう。これらの結合表面は重なり得る。二官能性または多官能性の試薬を選別するためのライブラリーを構築するために、タンパク分子の二以上の表面に適用される部位特異的突然変異およびランダム突然変異のストラテジーが用いられ得る。単鎖Fvまたは単鎖CD8の場合、突然変異のために好ましい領域は、CDRループと、scFv分子の他端にある反対のカウンターパートであろう。Fab分子の場合には、好ましい突然変異はCDRループと、定常ドメインの他端にある反対のカウンターパートループにおけるものであろう。

外に特記しない限り、ここで言及される全ての標準法は、

Sambrook et al., 1990の「分子クローニング - A実験室マニュアル」に記載されている。

実施例1 異なる長さのポリペプチドリンカーを用いた

単鎖Fvフラグメントとしての標的結合性ポ

リペプチドの構築および発現

NC10 (インフルエンザウイルスN9株上のノイラミニダーゼ (NA) 分子を認識するモノクローナル抗体) の親scFvフラグメントをデザインし、構築し、大腸菌中で発現させた (配列認識番号5)。アミノ末端の分泌シグナルP<sub>el</sub>Bによって、合成タンパクは大腸菌のペリプラズムに導かれ、そこで不溶性膜フラクションと会合された。オクタペプチド (FLAG; IBI USA) の尾部を、該scFvのカルボキシル末端に融合させ、引き続き精製工程を通して該scFvをモニターするために用いた。この試剤は二官能性であり、ノイラミニダーゼおよび抗FLAG抗体の両者に対して特異性を有する。

このscFv・NC10タンパクは、大腸菌膜フラクションを塩酸グアニジウムで溶解し、続いてカラムクロマトグラフィーにかけることによって精製された。精製されたscFv・NC10のサイズ排除HPLCによって、scFvフラグメントは単量体 (27 kDa) および二量体 (54 kDa) の大きさに対応する二つのピークを生じることが示された。更に、単量体型はN9NAに結合して320 kDaの複合体を形成するのに対し、二量体型はN9NAに結合して640 kDaの複合体を形成した。320 kDaの複合体は、単一のNA分子に結合している4つのscFv分子から構成されるのに対し、640 kDa複合体は、二つのNA分子に

結合している4つのscFv分子から構成される。電子顕微鏡によって、2つのノイラミニダーゼ四量体が、四つの二官能性scFv二量体によって緊密に結合している事が確認された (図15)。NC10・MabのscFv構築物との間で複合を形成しているインフルエンザ・ノイラミニダーゼのアジサシN9 (鳥類) 株について、高解像度の電子顕微鏡観察を行なった。ここで、該分子複合体は

ホホタングステン酸カリウム (potassium phospho-tungstate) (pH 7.0)、または酢酸ウラニル (pH 4.0) によって染色 (コントラスト化) した。

同じN9NAの、モノクローナルFab (32/3、NC35およびNC41) との分子複合体および全モノクローナルIgGs (32/3、NC41およびNC10) との分子複合体を画像化した、我々が以前に行なった広範な実験に基づいて、我々は、N9Na-scFv複合体の画像を、4つの架橋scFv二量体によって面と面で結合したノイラミニダーゼの頭部対の閉じた構造であり、この結合は緊密に充填された分子複合体が4重の点対称を維持するように行なわれていると解析することができた (図15)。N9Na-scFv分子複合体のこの画像解析は、溶液中で観察された複合体の分子量、Mr 610,000とまさに一致している。

scFvがノイラミニダーゼと複合体を形成している結晶のX線回折 (図14) では、二重の回転軸によって関係づけられる二つのscFv分子の間に緊密な会合ある事が実証された。二つの可能な二量体構造が考えられる。最初の例にお

いては、ペプチド尾部を持つ単一のポリペプチド鎖によってコードされたV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが二官能性のscFvを形成し、これが別のscFv分子と非共有結合的に会合する (図17)。二番目の例では、各Fvにおいて抗原結合表面 (TBR) を形成するV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが、非共有結合的に会合しており、該二つのFvはリンカーポリペプチドによって共有結合している (図17)。

分子モデル作成研究 (図14) によって、非共有結合的に会合した二量体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間の距離は少なくとも35オングストロームであるのに対して、共有結合した二量体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間の距離は25オングストローム未満であろう事が示される。我々は、隣接するペプチド結合間の距離を3.8オングストロームとし、またリンカーが理論的に広がり得る距離を、残基が15、10、5および0のリンカーpPOW/scFv・NC10構築物について夫々54、36、18、および0オングストロームと仮定して、scFvタンパクが異なる長さのリンカーによって抗原と結合した場合に形成されるscFv-N<sub>9</sub>A複合体のタイプを調査した。



リンカーの長さを短縮した一連の  $s c F v \cdot N C 10$  タンパクを作成した (図 5)。最初の  $p P O W - s c F v \cdot N C 10$  構築物は、3つの5量体ユニット  $G l y 4 S e r$  からなるポリペプチドリンカーを有している (この  $p P O W - s c F v N C 10$  構築物は15残基のリンカー、 $V_H 15 V_L$  と称される)。これらの5量体ユニットの各々を順番に除去す

ることによってリンカー欠損突然変異体を構築し、2、1および0ユニットを有する構築物 ( $V_H 10 V_L$ )  $V_H 5 V_L$ 、 $V_H V_L$  の残基リンカー  $p P O W - s c F v \cdot N C 10$  構築物と称す) が形成された。更に、 $V_H$  ドメインのカルボキシル末端が直接  $V_L$  ドメイン ( $V_H - 13 V_L$ ) に結合されるように、 $V_L$  ドメインの第一  $\beta$  鎖 (最初の13アミノ酸) を欠損させることによって  $s c F v - N C 10$  構築物が作成された。

#### リンカー長を短縮した $p P O W - s c F v - N C 10$ 構築の詳細

$p P O W - s c F v - N C 10$  構築物は、 $B s t E I I$  (New England Biolabs社) および  $S a c I$  (Pharmacia社) を用いて、製造業者の仕様書に従って連続的に消化され、ポリペプチドリンカーが除去された。制限酵素消化されたリンカーの無い  $p P O W - s c F v \cdot N C 10$  DNAを、0.8%アガロースゲルから電気泳動溶出し、0.3M酢酸ナトリウムおよび2.5倍体積量のエタノールを用いた沈殿によって濃縮した。合成オリゴヌクレオチドは、0.5単位の  $T 4$  ポリヌクレオチドキナーゼ (Pharmacia社)、1 mM  $M A T P$ 、およびOne-Phor-Allバッファープラス (Pharmacia社) 中において  $37^{\circ}C$  で30分間インキュベートすることにより、5'末端がリン酸化された。一対の相補的なリン酸化オリゴヌクレオチド・プライマー (図6) を予め等モル比で混合して、長さが変化した単鎖リンカーをコードするDNA二重体を形成した。これらの二重体を、アマーシャム社のライゲーション

キット (Amersham ligation kit) を用いて、 $B s t E I I - S a c I$  で制限分解された  $p P O W - s c F v \cdot N C 10$  プラスミド中に連結した。 $V_H - 13 V_L$  構築物を作成するには、若干異なったアプローチが必要とされた。欠損  $V_L$  ドメ

インに亘って広がるオリゴヌクレオチドプライマー（図6）を構築し、これをFLAG特異的なオリゴヌクレオチドプライマー（図6）と組合せて合わせて使用し、PCRによってscFv・NC10のV<sub>H</sub>-13V<sub>L</sub>フラグメントを増幅した。この増幅物をBstEIIおよびEcoRIで消化し、同様に消化されたpPOW-scFv・NC10プラスミド中に、アマーシャム社製のライゲーションキット（Amersham ligation kit）を使用して連結した。この連結混合物を、等体積量のフェノール/クロロホルムで抽出精製し、0.3M酢酸ナトリウムおよび2.5倍体積量のエタノール中で沈殿させた。この連結DNAを20mlのH<sub>2</sub>O中に再懸濁し、そのサンプル5mlを大腸菌DH5a（supE44, hsdR17、recA1, endA1, gryA96, thi-1, relA1）およびLE392（supE44, supF58, hsdR14, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55）中に形質転換した。細胞を1mlのLB培地中で1時間振盪し、100mg/mlのアンピシリンを含む2xYT培地にプレートした。pPOWベクターのPelBリーダー配列およびFLAG配列に向けられたオリゴヌクレオチドを用いたPCRスクリーニングによって、組換えクローンを同定した。短縮されたリンカー領域のDNA

配列は、二本鎖DNAをシーケナーゼ（Sequenase）2.0（United States Biochemical社）を用いた配列決定によって確認された。

#### 短縮リンカーを有するscFv・NC10タンパクのタンパク発現

形質転換されたLE392を、30℃のSB培地で一晚増殖させ、1:10に希釈して、新しいSB培地に接種した。培養物を30℃で振盪しながら、600nmでの吸光度（A<sub>600</sub>）が約4になるまで増殖させた。誘導期間（A<sub>600</sub>が7になるまで4時間続く）の残りの時間については、温度を42℃まで上昇させた。細胞を遠心分離機（Beckman JA10、6,000rpm 15分）から回収し、上澄液分画を除去した。細胞ペレットを、元の体積の10%で、20%シュークロース、10mM Tris・HCl、pH7.5中に再懸濁し、氷上に5分放置した。EDTAを5mMの最終容積にまで添加し、該混合物を更に10分間だけ氷上でインキュベートし、前記のようにして遠心分離し、細胞をペレット化した。上澄液を捨て、細胞ペレットを水中に

再懸濁し、該混合物を再度遠心分離し、ペリプラズミックタンパクを含んでいる上澄液を除去した。こうして得られた細胞ペレットを水中に再懸濁し、超音波（大規模調製では30のバーストを6回、小規模調製では30秒のバースチを1回）により溶解させ、氷上に5分放置した。遠心分離の後、水相は溶解細胞室分画として回収され、またペレットは不溶性膜結合分画を含んでいた。s c F v · N C 1 0の発現を確認するために、個々のクローンからの全細胞溶解物を還元状態下

でのSDS-PAGE、並びに抗FLAGモノクローナル抗体M2（図7）を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。28、29、31及び32 kDaで移動する単一の陽性バンドが観察された（図7、レーン13-16）。これらの分子量は、pPOW-s c F v · N C 1 0構築物を残基数0、5、10および15のリンカーと夫々組合せて合成されたs c F v · N C 1 0-FLAG融合タンパクの予想分子量と相関していた。残基数0、5および10のリンカーを有するs c F v · N C 1 0タンパクは、15残基のリンカーを有するタンパクと同じ特徴を示した。s c F v · N C 1 0-FLAG融合タンパクは大腸菌の不溶解膜に結合しており、その約半分は、塩酸グアニジニウムで処理にすることによって可溶化することができた。

この可溶性生成物は、ゲル濾過、並びにMono-Q上または尾部に対して特異的な抗体を含む親和性マトリックス上でのクロマトグラフィーによって精製された。該精製物については、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー（SE-HPLC）、超遠心分離分析、親抗原（インフルエンザ・ノイラミダーゼ）に対する結合活性、抗原と本剤との間に形成された複合体の電子顕微鏡観察によって特徴付けが行なわれた。架橋実験によって、該生産物の大きさ確認された。その特性を図8に要約して示した。

#### 実施例2 マウス及びヒトs c C D 8の構築

(G l y , S e r )<sub>3</sub>リンカーをコードする追加のヌクレオチドを有するV様ドメイン（配列認識番号1）に対して

相同性のプライマー（入手可能なデータベース配列を用いた）及び用い、ベント

ポリメラーゼ (Vent polymerase) でのPCRによって、マウスCD8のV様ドメインのみを含む $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖を別々に増幅した。二つの別々のドメインをアニールした後、dNTPsおよびポリメラーゼを用いて該生成物を伸長させた。scCD8遺伝子は、3'末端にMscI部位および5'末端にSalI部位を含む新しいプライマーを用いて増幅された。この単鎖生成物はMscIおよびSalIで消化され、次いでMscIおよびSalIで消化したpPOWベクター中にクローン化された。大腸菌宿主細胞株であるpop2136中において、高レベルのタンパク合成が得られた。正しく開裂した生成物の合成を増大させるために、N末端の修飾がデザインされた。これは、マウスCD8 $\alpha$ 鎖のN末端残基をリジンからセリンに変えることによって達成された（ヒトCD8のN末端残基はセリンである）。大腸菌宿主細胞株pop2136（全細胞溶解物を示している）を用いたpPOW中のscCD8の合成は、図10に見ることができる。合成されたscCD8生成物は、コンホメーション的に正しい形のタンパクのみを認識する抗CD8抗体によって検出された。

#### ヒト・scCD8

成熟 $\alpha$ 鎖タンパクのV様ドメインをコードするDNAが、Taqポリメラーゼと、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>リンカーをコードする追加のヌクレオチドを有し且つ制限酵素部位MscIおよびBamHIを含むV様ドメイン（配列認識番号2）

に対して相同性のプライマー（入手可能なデータベース配列を用いた）とを用いたPCRによって増幅された。CD8 $\beta$ 鎖のV様ドメインは、血液から単離されたDNAから、BamHIおよびEcoRI制限酵素部位を含むプライマーを用いたPCRによって直接増幅された。二つの個々の生成物は適切な酵素で消化され、次いでMscIおよびEcoRIで消化したpPOWベクター中に連結された。

各単鎖CD8構築物のDNA配列は、二本鎖DNAの配列決定によって確認された。このヌクレオチド配列は、配列認識番号1及び2に示されている。この例において、該ベクターは、診断用途および結合用途（アフィニティー精製を含む）のためのC末端ペプチド尾部を有するscCD8の合成を指令する。scCD

8 生成物の生物学的活性をモニターする好ましい技術には下記のものが含まれる

(a) 例えばバイオセンサ技術を用いたタンパクの結合親和性の直接の測定、  
或いは、全細胞または $\beta$ 2ミクログロブリン若しくはMHCクラスI分子の $\alpha$ 3  
ドメインのような細胞表面分子もしくはそのフラグメントに対する結合を用いた  
超遠心分離。

(b) C末端ペプチド尾部を診断マーカーに用いた、RMA-S細胞内で発現  
されたMHCクラスI分子（ペプチド付加された）に対する結合試験。

(c) 例えば、T細胞の活性化の際のIL2産生に対するペプチド依存性効果  
の変化をモニターするような機能阻害試験。

### 実施例3 リンカーを含まない抗グリコホリン1C3の構築

親1C3抗体およびscFv誘導体は、国際出願番号第PCT/AU93/00228号に  
開示されている。

オリゴヌクレオチドN2034

(5'-ACGTAGGTCACCGTCGCCTCCGACATCGTCATGTCACAGTCTCCATCCTCC-3')

は、何等の介在リンカーも含まずに1C3VL5'配列の最初の30塩基に結合し  
た、1C3VHの3'末端の最後の15塩基に対して相補性を有するように合成さ  
れた。

オリゴヌクレオチドN2035

(5'-TTTATAATCTCGGCGCGCCGATTAATTTC-3')

は、3'末端近傍のNotI部位の周囲にある、反対鎖上の1C3VL配列に対  
して相補性を有するように合成された。

この二つのオリゴヌクレオチドは、BstEIIおよびNotI制限エンドヌク  
レアーゼ部位に隣接する5'-VLに並列された3'-VH配列の1C3生成物を  
製造するために、1C3鋳型DNAと共にポリメラーゼ連鎖反応に用いられた。

制限エンドヌクレアーゼ部位BstEIIおよびNotIを有するPCR生成物  
をインキュベートした後、得られたフラグメントは、予めBstEIIおよびNo  
tIで消化して介在配列を除去した、1C3・scFv配列を含むベクターpH

FAと連結された。この連結生成物は、大腸菌株TG1を形質転換するために用いられた。挿入物を含む形質転換体コロニーは、配列認識番号4に示したDNA配列を含むことが確認された。

この遺伝子構築物は、非抑制大腸菌株に導入され且つIPTGで誘導されたときに、このベクターまたは関連ベクター類中で発現され、また1C3コーディング領域を熱誘導性発現ベクターpPOWに導入することによって発現された。

#### 実施例4 大腸菌の変異株を用いた突然変異

組換え抗ノイラミニダーゼ抗体NC10・scFvの発現をコードするNC10・scFvプラスミドを、電気穿孔法により大腸菌mutDに導入した。突然変異体は、サンプルを図11に示す突然変異サイクルに供することによって製造された。これらは、YT+AMP+TET中において、指数相で50世代だけ増殖され（プラスミドDNAの突然変異を誘発するため）、次いでヘルパーファージを用いて救出された。救出されたファージは、予め10 $\mu$ g/mlの抗原をコーティングした免疫チューブに掛けられ、PBS等で洗浄して非結合ファージを除去し、特異的に結合したファージを100mMトリエチルアミンで溶出し、0.5容積の1M Tris-ヒドロキシメチルメチルアミン-HCl pH7.5中に回収し、次いで標準法によってmutD細胞中にトランスフェクトした（特に断らない限り、ここで言及する全ての標準法はSambrook et al., 1990の「分子クローニング-A実験室マニュアル」に記載されている）。また、細胞を対数相増殖に維持しながら、再度50世代の増殖を行なった。適切な回数の突然変異選別ラウンド（この実施例では3回）を実施した後のファージ力価は、10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>ファージ/mlである。最終パンニング工程の後、溶出されたファージは大腸菌TG1細胞中にトラン

スフェクトされ、YT+AMP+グルコースのプレートに撒かれ、単離された各コロニーはファージ救出に先立って増殖され、「flu」ウイルスまたはグリコホリン上でのELISAによって分析された。ELISA活性のレベルで非野生型を発現したコロニーは、次いで増幅され、DNA配列が決定され、また可溶性の発現のために、該ファージはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

から入手可能な大腸菌HB2151中にトランスフェクトされた。このファージは標準法によってHB2151にトランスフェクトされ、夫々のファージサンプルの選別された個々のコロニーは、YT+AMP (100  $\mu$ g/ml) 中で増殖され、次いで1 mMのIPTG (イソプロピルチオガラクトシド) を用いて37°Cで4~16時間誘導され、引き続き4°Cで16時間任意にインキュベートされた。この培養上清および周辺細胞質抽出物、細胞膜および細胞質を回収し、上記のようにして組換え遺伝子の発現について分析した (Power et al., 1992, Gene)。

#### 実施例5

国際出願番号第PCT/AU93/00228に号記載されているようにして調製したファジミドpHFA中の組換え1C3・scFv (グリコホリン結合性抗体コーディング領域) を、実施例4に記載したようにしてmutD大腸菌内でのランダム突然変異に供し、また選別プロトコルを同様に適用した。但し、この選別には固相マトリックス (ELISAプレート、免疫チューブまたはラテックスビーズ) をグリコホリンAのPBS溶液 (10  $\mu$ g/ml) でコーティングすることが含まれ

ている。個々のクローンを選別するためのELISAスクリーニングの結果は、図12に示されている。抗FLAG抗体での検出を用いた競合ELISA試験が、突然変異後の選別されたコロニーに対して行なわれた。表1は、発現されたタンパクの、抗原 (アジアログリコホリン) に対する相対的な親和性が増大したことを示している。

表 1

クローン化された 組換え scFv	突然変異	親和性 $\mu$ M (オフ・レート)
1C3	wt	62
1C3・A13		40
1C3・B7		29

#### 実施例6

ファジミドベクターpHEN中のscFvライブラリー (メディカルリサーチ・カウンセラ社、U. K.) を大腸菌のmutT株にトランスフェクトし、ま

た突然変異ならびに修飾された結合能力での s c F v の検出および選別のために、実施例 4 または 5 のように処理された。グリコホリンバイндаについて選別する。入手可能なグリコホリン結合性抗体の範囲を増やすために、突然変異およびファージ表現ライブラリーのアフィニティー選別の出発点として、本来の s c F v ライブラリーが用いられた。本来の s c F v ファージ表現ライブラリーから選別された二つの独特な抗グリコホリン s c F v は、その後に突然変異されることが示されたその V k 4

鎖の領域について示される推定アミノ酸配列を有しており、これは表 2 に示される。

表 2

FTASTG DV P D R F S G S G S G T D F T L R I S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q A S V F P  
C I Y W N P D S P D R F S G S G S G T D F T L R I S L Q A E D V A V Y Y C Q Q A S V F P

これら夫々の分子のアフィニティー成熟は、図 1 1 に示したように、突然変異 (m u t D 5) アフィニティー選別サイクルを用いることによって達成された。突然変異分子のサブセットにもたらされる変化を表 3 に示す。



表 3

本来のライブラリ		
から選別された	突然変異 A. A.	親和性 $\mu$ M
<u>s c F v</u>	<u>(位置)</u>	<u>(オフ・レート)</u>
A 9	w t	4 8
A 9. 5	S - V (98)	1 5
A 9. 1 3	G - D (63)	2 4
	V - S (64)	0. 06
E 3	w t	1 8
E 3. 1	S - Q (82)	9
E 3. 2	S - T (83)	2
C 1 2	w t	1 1
C 1 2. 1	G - Q (48)	3 5
C 1 2. 2	L - G (15)	1

## 実施例 7

D. ディスコイデウム中での抗体フラグメントコーディング領域の発現は、親ベクター p 569 (ドイツ国ミュンヘンのマックスプランク研究所の W. Nellen 氏からの贈与) および以下に記載する V<sub>H</sub> コーディング領域から構築された、ベクター AV 1 によるものである。ベクター p 569 は図 1 3 に示されている。これは、 $\alpha$ -L フコシダーゼプロモータ及び細胞表面に発現された「リガンド結合性ペプチド」の分泌のためのシグナル配列を用いた大腸菌 D. ディスコイデウム・シヤトルベクターの一つのファミリーである。表 4 は、抗 FLAG 抗体 (M2) によって検出された、インフルエンザ NC 4 1 V<sub>H</sub> FLAG の発現のイムノドットプロットの結果を示している。

モノクローナル抗体 NC 4 1 の V<sub>H</sub> コーディング配列が、下記のオリゴヌクレオチド配列を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって増幅された。

N 8 4 9

5' CCTTGCCTGCAGGTCGACCTATGGACAGGTGCAGCTGCAGCAG 3'

N 8 6 3

5' TTACCATGGTTACTTGACCTTAATCAGCAGGACAAATGAAATAAATTTATCATCAT  
CATCTTTATAATC 5'

N849は、 $\alpha$ -L-フコシダーゼシグナル配列、開裂部位ならびに発現ベクターp569へのクローニングに適したSalI制限部位と共に、NC41V<sub>1</sub>コーディング領域のN末端に対して相補的な配列を含んでいる。

N863は、トランスメンブラン疎水性配列、クローニングのためのNcoI制限部位および翻訳停止コドンと共に、NC41V<sub>1</sub>のFLAGコーディング配列に対して相補的な配列を含んでいる。

ベクターpAV569（ドイツ国マルチンスライドのマックスプランク研究所のW. Nellen氏からの贈与）のDNAを制限酵素NcoIおよびSalIで消化し、切断されたベクターを、アガロース電気泳動およびフェノール抽出の標準技術によって精製した。

PCRで増幅され、制限酵素で消化されたNC41V<sub>1</sub>・FLAGをベクター中に連結し、この混合物を大腸菌に形質転換した。組換え体コロニーをアンピシリン含有YTプレート上で選別し、組換えプラスミドを回収し、標準技術を用いて精製および同定した。この組換えプラスミドは、pAV1と称する。

組換えプラスミドpAV1を、Friendlender and MellaによってGB-2159821に開示された摂食法（feeding method）を用いることによって、D. ディスコイデムの休止細胞中に形質転換した。

組換え体D. ディスコイデムを、DMB培地上において、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗生物質G418を用いて選別した。組換え体D. ディスコイデム・アモエバエ（D. discoideum amoebae）を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のG418を含むDMB培地の2ml培養で増殖させた。22℃で48時間の増殖の後、培養上清の $100\mu\text{l}$ アリコートについてドットプロット分析を行ない、抗FLAG

抗体を用いて、培養中のNC10V<sub>1</sub>・FLAG抗体フラグメントの存在を検出した。その結果を表4に示す。

表 4

D. ディスコイデウムにおける

NC10V<sub>H</sub> - FLAGの発現

抗FLAG抗体を用いたドットプロット免疫検出

D. ディスコイデウムのクローン# 抗体による検出

陰性対照	-
陰性対照	-
陽性対照	+++
9C組換えD. ディスコイデム	+
9D       "	-
9E       "	++
9F       "	-
9G       "	++
8B       "	+++
8C       "	-
8D       "	+++
8E       "	+++
8F       "	-
8G       "	+++
7D       "	+
7E       "	-
7F       "	+
7G       "	-

- : 反応なし

+++ : 強い反応

+ : 弱い反応

## 実施例8

D. ディスコイデウム内の発現のための、1C3Fabを含む組換えベクターの構築。親ベクター (p569) の構造は図13に示されており、該ベクター

は、制限消化によるBamHI/BglIIフラグメントの除去および再連結によって修飾され、下記のプライマーおよび鋳型としての1C3Fabを用いたPCRで構築された抗体コーディング領域をクローニングするための、独特のXbaIおよびSspI部位が残された。

5' CAGGTCGACTCTAGAGTATGGGAGGTGAGGCTTCTCGAG 3'

5' AAATTTATAATTATTTATCATCATCATCTTTATAATC 3'

このFabは、グリコホリン並びに抗FLAGおよび抗EEF抗体についての結合活性(TBRs)を組合せているから、多官能性ポリペプチドである。PCR生成物の制限消化に続いて、大腸菌における構築のために、標準的な精製、連結および形質転換プロトコールが行なわれた。D. ディスコイデウムの形質転換は、摂食形質転換された大腸菌によって(GB-2159821A参照)、或いはリン酸カルシウム結晶法(Nellen et al., Mol. Cell. Biol., 1984, 4, 2890-2898)もしくは電気穿孔法(Howard et al., 1988, 16, 2613-2623)のような文

献に発表された当業者に公知の標準法により、G418(ゲネチシン(geneticin))上での選別を伴って行なわれる。

本発明の一般的な範囲が、上記で詳細に述べた特定の実施例に限定されないことは明瞭に理解されるであろう。

#### 配列確認番号1

ファイル: B:\POWLY23V.配列

説明: FLAG尾部を有するMscI-SalIに連結されたJLApe1B Ly-2+Ly-3 Vドメイン

塩基番号: 1~849

全塩基数: 849

```

      M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      H A K P Q A P E L R I F P K K H D A E L
61 ATGGCCAAGC CACAGGCACC CGAACTCCGA ATCTTTCCAA AGAAAATGCA CGCCGAACTT

      G Q K V D L V C E V L G S V S Q G C S W
121 GGTCAGAAGG TGGACCTGGT ATGTGAAGTG TTGGGGTCCG TTTCGCAAGG ATGCTCTTGG

      L F Q N S S S K L P Q P T F V V Y M A S
181 CTCTCCAGA ACTCCAGCTC CAAACTCCCC CAGCCCACCT TCGTTGTCTA TATGGCTTCA

      S H N K I T W D E K L N S S K L F S A M
241 TCCCAACAACA AGATAACGTG GGACGAGAAG CTGAATTCGT CGAAACTGTT TTCTGCCATG

      R D T N N K Y V L T L N K F S K E N E G
301 AGGGACACGA ATAATAAGTA CGTTCTCACC CTGAACAAGT TCAGCAAGGA AAACGAAGGC

      Y Y F C S V I S N S V M Y F S S V V P V
361 TACTATTCTT GCTCAGTCAT CAGCAACTCG GTGATGTACT TCAGTTCTGT CGTGCCAGTC

      L Q G G G G S G G G G S G G G S L I Q
421 CTTCAGGCTC GCGGAGGCTC AGGCGGTGGT GGATCAGGTG GCGGCGGATC TCTCATTGAG

      T P S S L L V Q T N H T A K H S C E V K
481 ACCCCTTCGT CCCTGCTGGT TCAAACCAAC CATACGGCAA AGATGTCCTG TGAGGTTAAA

      S I S K L T S I Y W L R E R Q D P K D K
541 AGCATCTCTA AGTTAACAAG CATCTACTGG CTGCGGGAGC GCCAGGACCC CAAGGACAAG

      Y F E F L A S W S S S K G V L Y G E S V
601 TACTTTGAGT TCCTCGCCTC CTGCAGTTCT TCCAAAGGAG TTTTGTATGC TGAAAGTGTG

      D K K R N I I L E S S D S R R P F L S I
661 GACAAGAAAA GAAATATAAT TCTTGAGTCT TCAGACTCAA GACGCCCCCTT TCTCAGTATC

      M N V K P E D S D F Y F C A T V G S P K
721 ATGAATGTGA AGCCAGAGGA CAGTGACTTC TACTTCTGCG CGACGTTGG GAGCCCCAAG

      M V F G T G T K L T V V D Y K D D D D K
781 ATGCTCTTTG GCACAGGGAC GAAGCTGACT GTGGTTGATT ACAAGGACGA CGATGACAAG

      * S T
841 TAGTCGACA

```

## 配列確認番号2

ファイル: B:\CD8ACD8B.配列

説明: pPOW (peIB CD8aおよびCD8b V dom) 中のヒト単鎖CD8

塩基番号: 1~822

全塩基数: 822

```

      M K Y   L L P T   A A A   G L L   L L A A   Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GCATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      M A S   Q F R V   S P L   D R T   W N L G   E T V
61 ATGGCCAGCC AGTTCCGGGT GTCCCGCTG GATCGGACCT GGAACCTGGG CGAGACAGTG

      E L K   C Q V L   L S N   P T S   G C S W   L F Q
121 GAGCTGAAGT GCCAGGTGCT GCTGTCCAAC CCGACGTCGG GCTGCTCGTG GCTCTTCCAG

      P R G   A A A S   P T F   L L Y   L S Q N   K P K
181 CCGCGCGGCG CCGCGGCCAG TCCCACCTTC CTCCTATACC TCTCCCAAAA CAAGCCCAAG

      A A E   G L D T   Q R F   S G K   R L G D   T F V
241 GCGGCCGAGG GGCTGGACAC CCAGCGGTTC TCGGGCAAGA GGTGGGGGA CACCTTCGTC

      L T L   S D F R   R E N   E G Y   Y F C S   A L S
301 CTCACCCTGA GCGACTTCCG CCGAGAGAAC GAGGGCTACT ATTTCTGCTC GGCCCTGAGC

      N S I   H Y F S   H F V   P V F   L P A G   G R G
361 AACTCCATCA TGTACTTCAG CCACTTCGTG CCGGTCTTCC TGCCAGCGGG CGGCCGCGGT

      S G G   G G S G   G G G   S L Q   Q T P A   Y I K
421 TCAGGTGGAG GTGGATCCGG AGGCGGTGGA TCTCTCCAGC AGACCCCTGC ATACATAAAG

      V Q T   N K M V   M L S   C E A   K I S L   S N M
481 GTGCAAACCA ACAAGATGGT GATGCTGTCC TGCGAGGCTA AAATCTCCCT CAGTAACATG

      R I Y   W L R Q   R Q A   P S S   D S H H   E F L
541 CGCATCTACT GGCTGAGACA GCGCCAGGCA CCCAGCACTG ACAGTCACCA CGAGTTCTTG

      A L W   D S A K   G T I   H G E   E V E Q   E K I
601 CCCCTCTGGC ATTCGCGCAA AGGGACTATC CACGGTGAAG AGGTGCAACA GCAGAAAGATA

      A V F   R D A S   R F I   L N L   T S V K   P E D
661 GCTGTGTTTC CGCATGCAAG CCGGTTTATT CTCAATCTCA CAAGCGTGA GCGGGAAGAC

      S G I   Y F C M   I V G   S P E   L T F G   K C T
721 ACTGGCATCT ACTTCTCCAT GATCGTCCGG AGCCCCGAGC TGACCTTCCG GAAGCGAAGT

      Q L S   V V D Y   K D D   D D K   .
781 CAGCTGAGTC TCGTTGATTA CAAGCACGAC GATGACAAGT AG

```

## 配列確認番号3

ファイル: B:\MHCA3.配列

説明: pPOW pelB Msc-EcoRI (FLAGなし) 中のMHCI a3 H-2Kドメイン

塩基番号: 1~371

全塩基数: 371

```
      M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1  ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCTGC CCAACCAGCG

      M A K A H V T H H R R P E G D V T L R C
61 ATGGCCAAGG CCCATGTCAC CCATCACC GC AGACCTGAAG GTGATGTCAC CCTGAGGTGC

      W A L G F Y P A D I T L T W Q L N G D E
121 TGGGCCCTGG GCTTCTACCC TGCTGACATC ACCCTGACCT GGCAGTTCAA TGGGGACGAG

      L T Q E H E L V E T R P A G D G T F Q K
181 CTGACCCAGG AAATGGAGCT TGTGGAGACC AGGCCTGCAG GGCATGGAAC CTTCCAGAAG

      W A S V V V P L G K E Q K Y T C H V E H
241 TGGGCATCTG TGGTGGTGCC TCTTGGGAAG GAGCAGAACT ACACATGCCA TGTGGAACAT

      E G L P E P L T L R W G K E E P P S S T
301 GAGGGGCTGC CTGAGCCCT CACCCTGAGA TGGGGCAAGG AGGAGCCTCC TTCATCCACC

      K * N
361 AAGTAGAATT C
```

配列確認番号4

pHFA中に構築されたリンカー無しの1C3

pHFA中のHind III部位から遺伝子3配列の開始まで

```

1   aag ctt gca tgc aaa ttc tat ttc aag gag aca gtc ata ATG AAA TAC
      L L P T A A A G L L L L A A Q P
49  CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG
      A M A E V K L Q E S G G G P V Q
97  GCC ATG GCC GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA GGT GCC CCG GTA CAA
      P G G S L K L S C A A S G F D F
145 CCT GGA GGA TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCA GGA TTC GAT TTT
      S R Y W M N W V R R A P G K G L
193 AGT AGA TAC TGG ATG AAT TGG GTC CGG CGG GCT CCA GGG AAG GGG CTA
      E W I G E I N Q Q S S T I N Y S
241 GAG TGG ATT GGA GAA ATT AAT CAA CAA AGC AGT ACG ATA AAC TAT TCG
      P P L K D K F I I S R D N A K S
289 CCA CCT CTG AAG GAT AAA TTC ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAA AGT
      T L Y L Q H N K V R S E D T A L
337 ACC CTG TAC CTG CAA ATC AAC AAA GTG AGA TCT GAG GAC ACA GCC CTT
      Y Y C A R L S L T A A G F A Y W
385 TAT TAT TGT GCA AGA CTT TCT CTT ACT GCG GCA GGG TTT GCT TAC TGG
      G Q G T L V T V A S D I V M S Q
433 GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACC GTC GCC TCC GAC ATC GTC ATG TCA CAG
      S P S S L A V S V G E K V T H S
481 TCT CCA TCC TCC CTG GCT GTG TCA GTA GGA GAG AAG GTC ACT ATG AGC
      C R S S Q S L F N S R T R K N Y
529 TGC AGA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAC TAC
      L T W Y Q Q K P G Q S P K P L I
577 TTG ACT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CCG CTG ATC
      Y W A S T R E S G V P D R F T G
625 TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC
      S G S G T D F T L T I S S V Q A
673 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT
      E D L A D Y Y C K Q S Y N L R T
721 GAA GAC CTG GCA GAT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTT CGG ACG
      F G G G T K L E I N R A A A D Y
769 TTC GGT GGA GCC ACC AAG CTG GAA ATT AAT CCG GCG GCC GCA GAT TAT
      K D D D D K A A T V E S C L
817 AAA GAT GAT GAT GAT AAA TAG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TCT TTA
      A K
865 GCA AAA.....

```



*pelB* signal sequence

M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A  
 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCG

H1 Pst1 H10  
 M A Q V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V  
 ATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTG

H20 H30  
 R M S C K A S G V T F T N Y N M Y W V K  
 AGGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAATTACAACATGTACTGGGTAAAA

H40 H50 H52A  
 Q S P G Q G L E W I G I F Y P G N G D T  
 CAGTCACCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAATTTTTATCCAGGAAATGGTGATACT

H60 H70  
 S Y N Q K F K D K A T L T A D K S S N T  
 TCCTACAATCAGAAGTTCAAAGACAAGGCCACATTGACTGCTGACAAATCCTCCAACACA

H80 H82A H82C H90  
 A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R  
 GCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGA

H100 H100E BstE2  
 S G G S Y R Y D G G F D Y W G Q G T T V  
 TCGGGGGGCTCCTATAGATACGACGGAGGCTTTGACTACTGGGGCCAAGGACCACGGTC

H110 linker L1  
 T V S G G G G S G G G G S G G G G S D I  
 ACCGTCTCCGGTGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTTCGGATATC

SacI L10 L20  
 E L T Q T T S S L S A S L G D R V T I S  
 GAGCTCAGACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGT

L30 L40  
 C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q N P D G  
 TGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAAACTGGTATCAACAGAATCCAGATGGA

L50 L60  
 T V K L L I Y Y T S N L H S E V P S R F  
 ACTGTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAATTTACACTCAGAAGTCCCATCACGGTTC

L70 L80  
 S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D  
 AGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAGAT

L90 L100  
 I A T Y F C Q Q D F T L P F T F G G G T  
 ATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGATTTTACGCTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACC

XhoI FLAG EcoRI  
 K L E I R D Y K D D D D K \* \*  
 AAGCTCGAGATAAGAGACTACAAAGACGATGACGATAAATAATAAGAATTC

配列確認番号 6

ファイル: A:\IC3FAB.配列

説明: IC3 Fab中の抗グリコホリン

塩基番号: 1~1443

全塩基数: 1443

1 aaaaaagcGG CCCAGCCGGC CATGGCCGAG GTGAGGCTTC TCGACTCTCG AGGTGGCCCG  
 61 GTACAACCTG CAGGATCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGCCT CAGGATTCCA TTTTAGTAGA  
 121 TACTGGATGA ATTGGgtcCG GCGGGCTCCA GGGAAAGGGC TAGAGTGGAT TGCACAAATT  
 181 AATCAACAAA GCAGTACGAT AAACCTATTCG CCACCTCTGA AGGATAAAATT CATCATCTCC  
 241 AGAGACAACG CCAAAAGTAC GCTGTACCTG CAAATGAACA AACTGAGATC TGAGGACACA  
 301 GCCCTTTATT ATTGTGCAAG ACTTTCTCTT ACTGCGGCAG GGTTCGCTTA CTGGGGCCAA  
 361 GGGACTCTGG TCACTGTCTC TGCAGCCAAA ACGACACCCC CATCTGTCTA TCCACTGGCC  
 421 CCTGGATCTG CTGCCCCAAC TAACTCCATG GTGACCCTGG GATGCCTGGT CAACGGCTAT  
 481 TTCCCTGAGC CAGTGACAGT GACCTGGAAC TCTGGATCCC TGTCCAGCGG TGTGCACACC  
 541 TTCCAGCTG TCCTGCAGTC TGACCTCTAC ACTCTGAGCA GCTCAGTGAC TGTCCCTCC  
 601 AGCACCTGGC CCAGCGAGAC CGTCACTGC AACGTTGCCC ACCCGGCCAG CAGCACCAAG  
 661 GTGGACAAGA AAATTgaaga attttaatta aaacatggaa ataaaGTGAA ACAAAAGCACT  
 721 ATTGCACTGG CACTCTTACC GTTACTGTTT ACCCCGGTAA CCAAAGCCGA CATCGTCATG  
 781 TCACAGTCTC CATCTCCCT GGCTGTGTCA GTAGGAGAGA AGGTEACTAT GAGCTGCAGA  
 841 TCCAGTCAGA GTCTGTTCAA CAGTAGAACC CGAAAGAACT ACTTCACTTC GTACCACCAG  
 901 AAACCAGGGC AGTCTCCTAA ACCGCTGATC TACTGGGCAT CCACTAGGGA ATCTGGGGTC  
 961 CCTGATCGCT TCACAGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTC A CTCTCACCAT CAGCACTCTG  
 1021 CAGGCTGAAG ACCTGGCAGA TTATTACTGC AAGCAATCTT ATAATCTTCG GACCTTCGGT  
 1081 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT TAAACGGGCT GATGCTCCAG TATCCATCTT CCCACCATCC  
 1141 AGTGAGCAGT TAACATCTGG ATCTCGAGGT CCCTCACTCC TGTGCTTCTT GAACAACTTC  
 1201 TACCCCAAAG ACATCAATCT CAAGTGGAAG ATTGATGGCA CTCAAACACA AAA'TCCCTC  
 1261 CTGAACAGTT CGACTGATCA GGACAGCAAA GACAGCACTT ACAGCATGAG CAGCACCTTC  
 1321 ACGTTGACCA AGCACCACCTA TCAACGACAT AACACCTATA CCTCTGAGGC CACTCACAAG  
 1381 ACATCAACTT CACCCATCTT CAAGAGCTTC AACACGGqag AGTGTgcggc cgcagacal  
 1441 aaa

【図1】

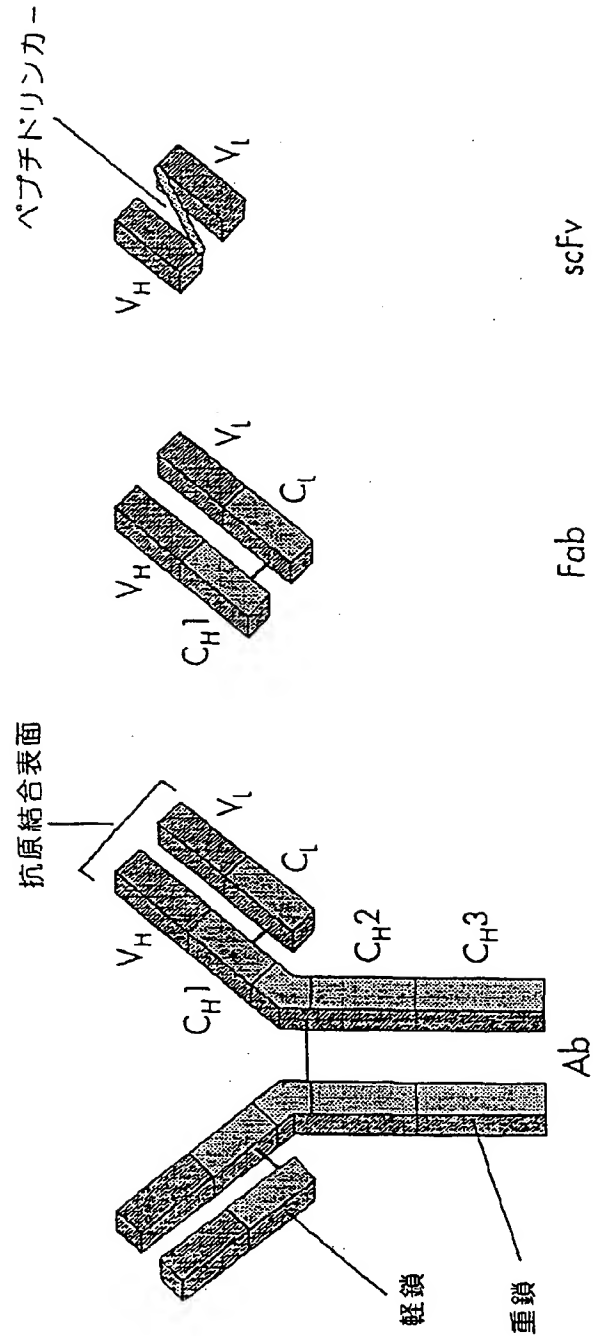


FIGURE 1

【図2】

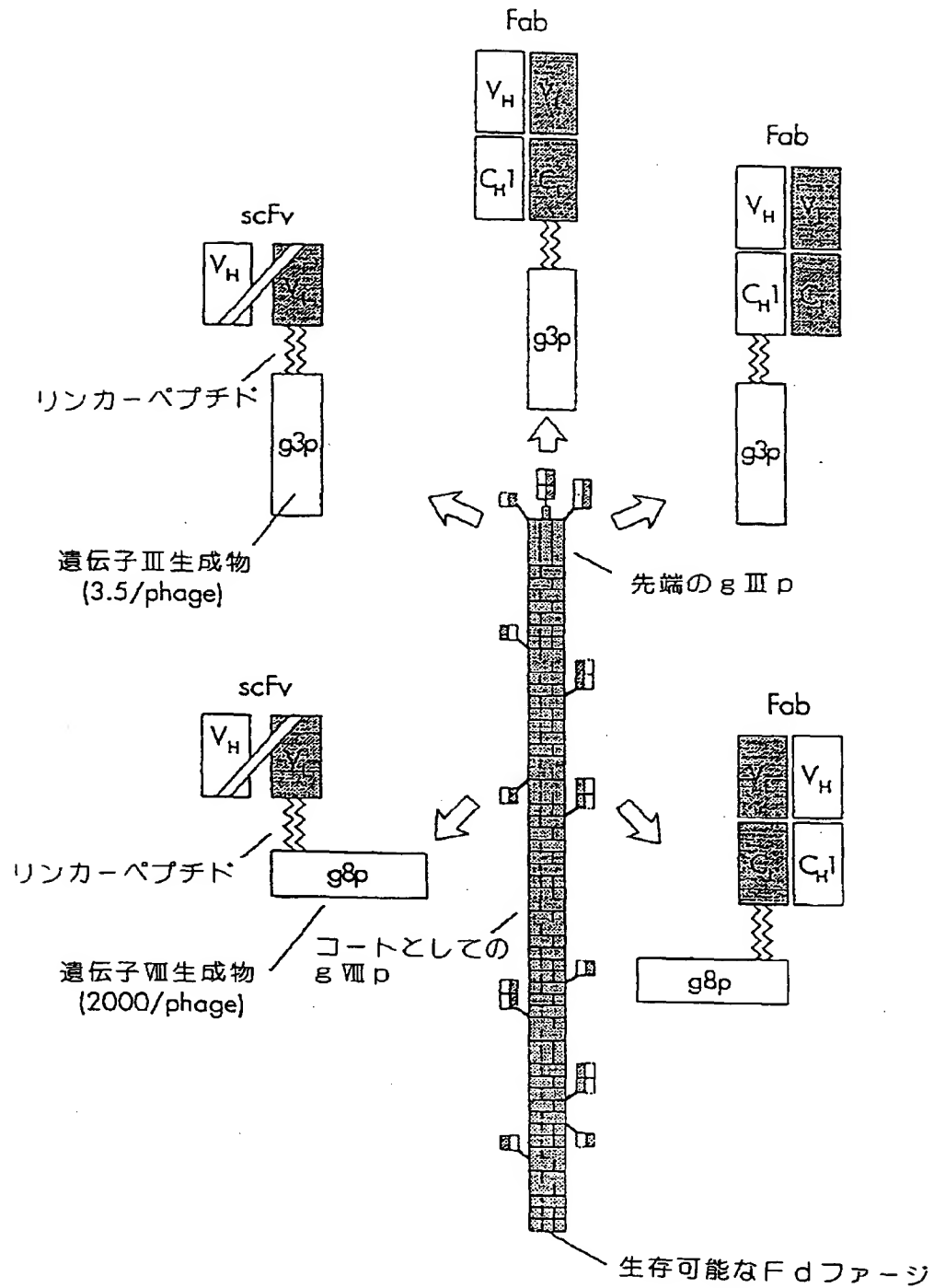


FIGURE 2

【図3】

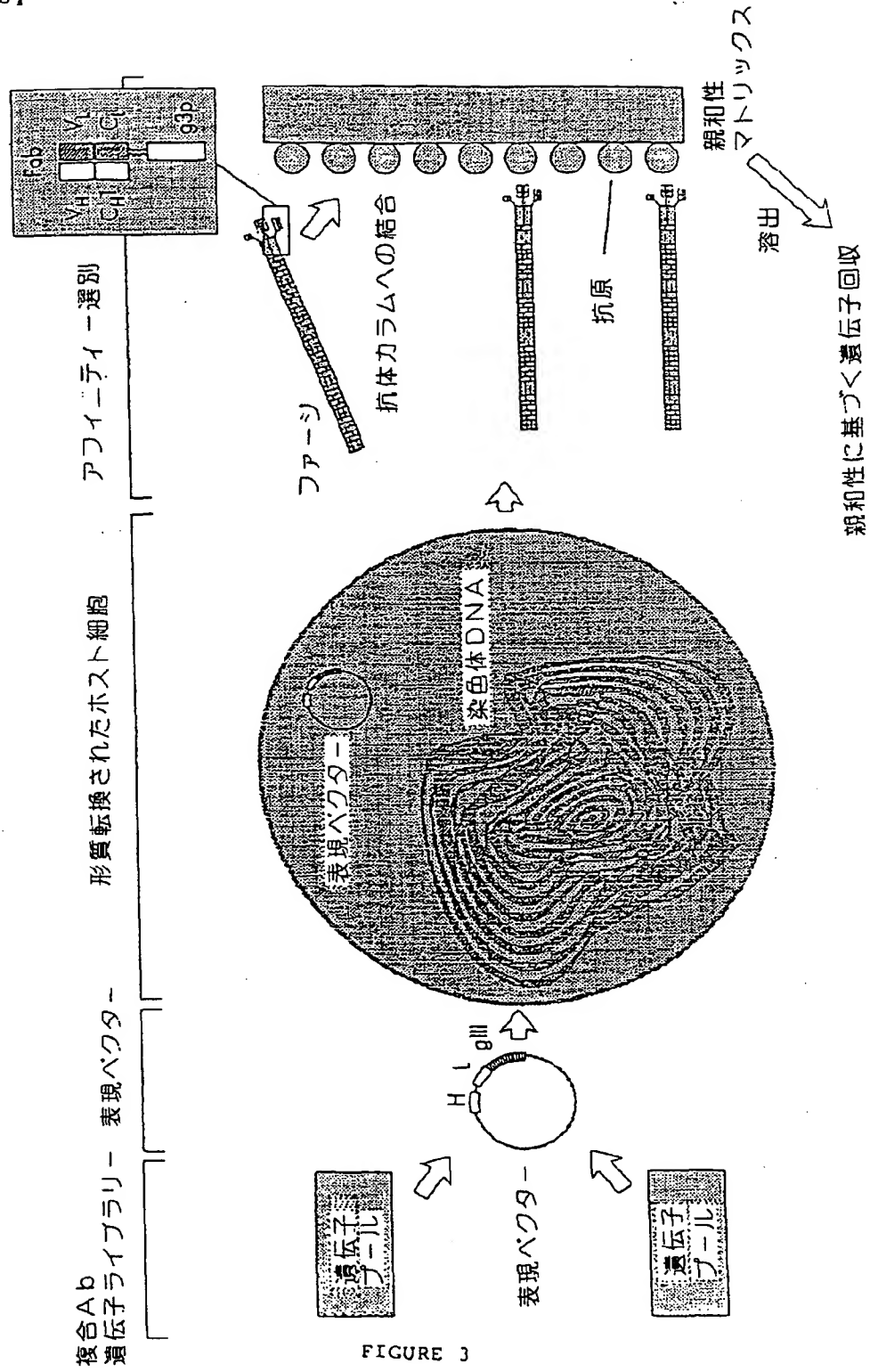


FIGURE 3

【图4】

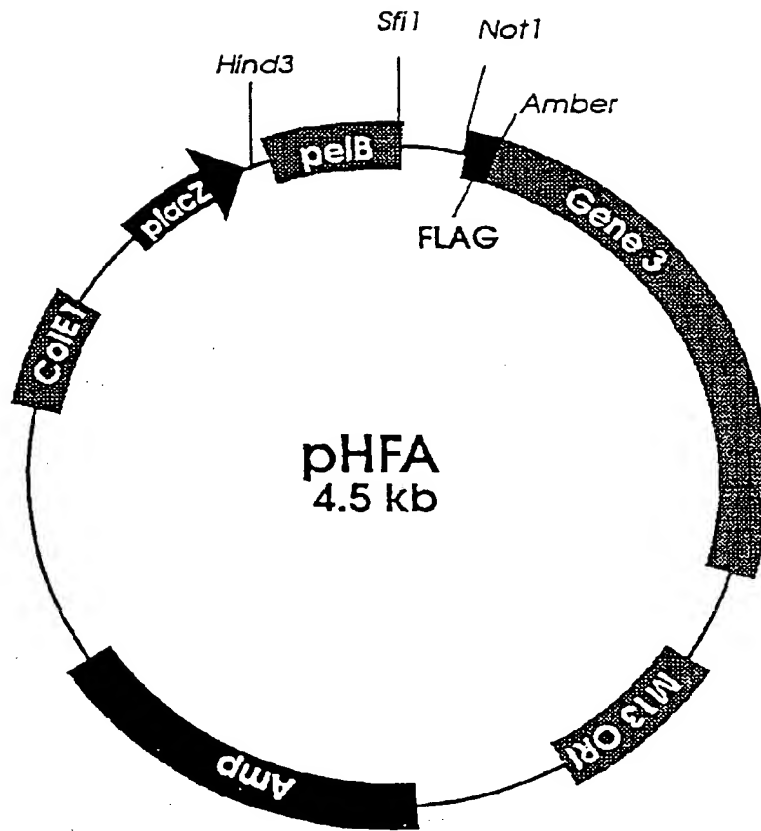


FIGURE 4

【図5】

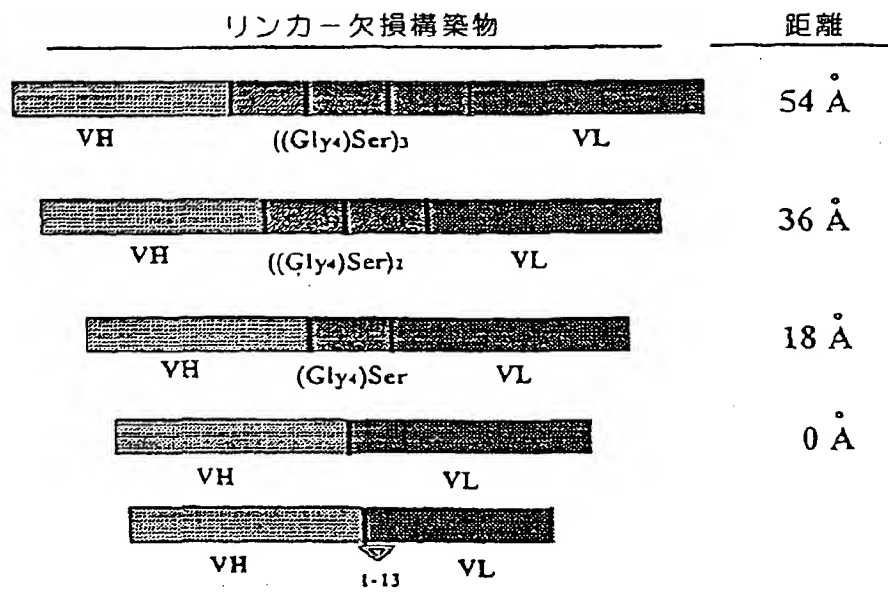


FIGURE 5

【図6】

## リンカー欠損構築物

構築物	相補性オリゴヌクレオチド対
((Gly <sub>4</sub> )Ser) <sub>3</sub>	5' GTC ACC GTC TCC (GGT GGT GGT GGT TCG) <sub>3</sub> GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG (CCA CCA CCA CCA AGC) <sub>3</sub> CTA TAG C 5'
((Gly <sub>4</sub> )Ser) <sub>2</sub>	5' GTC ACC GTC TCC (GGT GGT GGT GGT TCG) <sub>2</sub> GAT ATC CAG CT 3' 3' G CAG AGG (CCA CCA CCA CCA AGC) <sub>2</sub> CTA TAG C 5'
(Gly <sub>4</sub> )Ser)	5' GTC ACC GTC TCC GGT GGT GGT GGT TCG GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG CCA CCA CCA CCA AGC CTA TAG C 5'
-	5' GTC ACC GTC TCC GAT ATC GAG CT 3' 3' G CAG AGG CTA TAG C 5'
-13.VL	5' GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC 5' GTC GAC GAA TTC TTA TTA TTT ATC GTC ATC ATC TTT GTA GTC 3'

FIGURE 6



【图7】

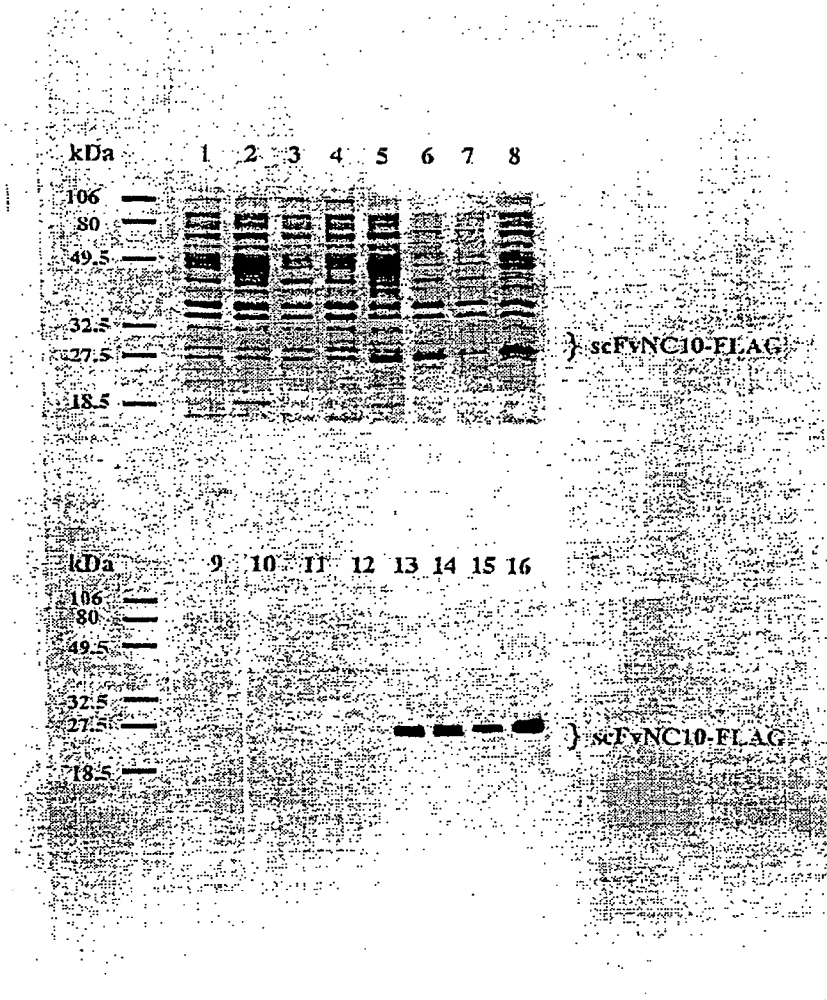


FIGURE 7

【図8】

リンカー欠損構築物

<u>リンカー単位</u>	<u>観察された形</u>	<u>活性</u>
$((\text{Gly}_4)\text{Ser})_3$	モノマー & 二量体	++
$((\text{Gly}_4)\text{Ser})_2$	二量体	++
$(\text{Gly}_4)\text{Ser}$	二量体	++
-	多量体	+
-13.VL $\Delta$	多量体	

FIGURE 8

【図9a】

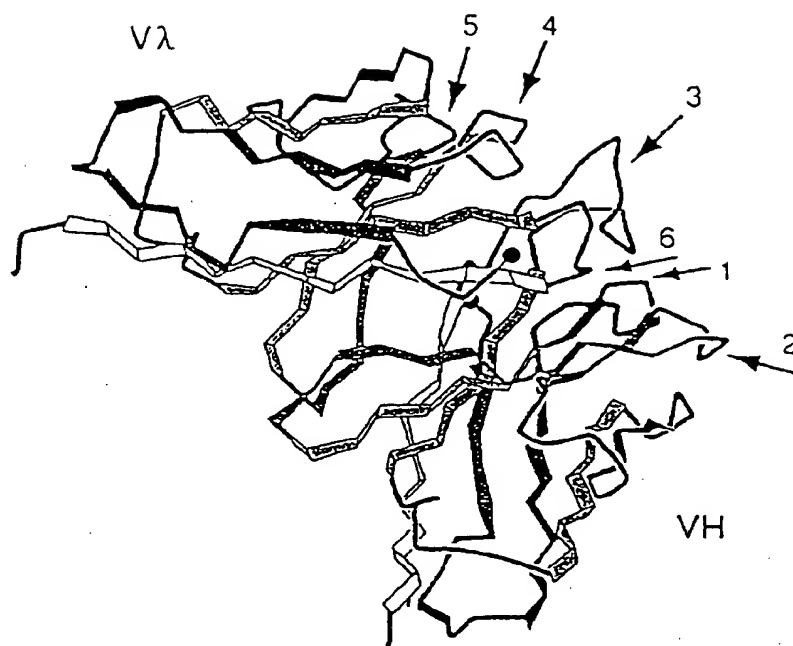


FIGURE 9a

【図9b】

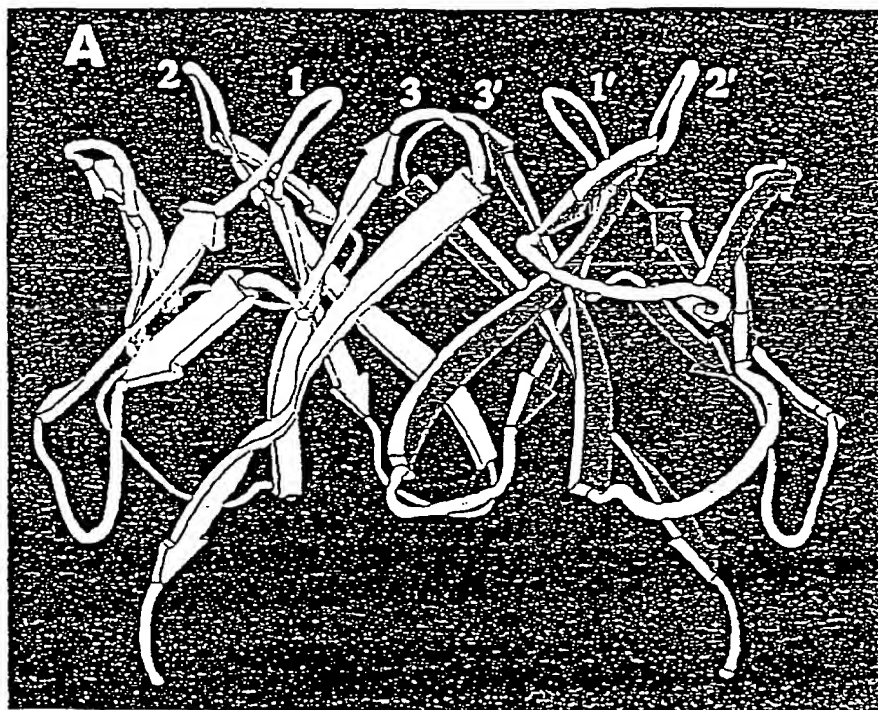


FIGURE 9b

【図10】

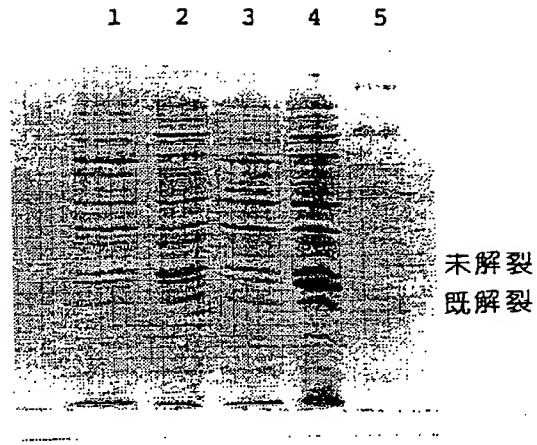


FIGURE 10

【図11】

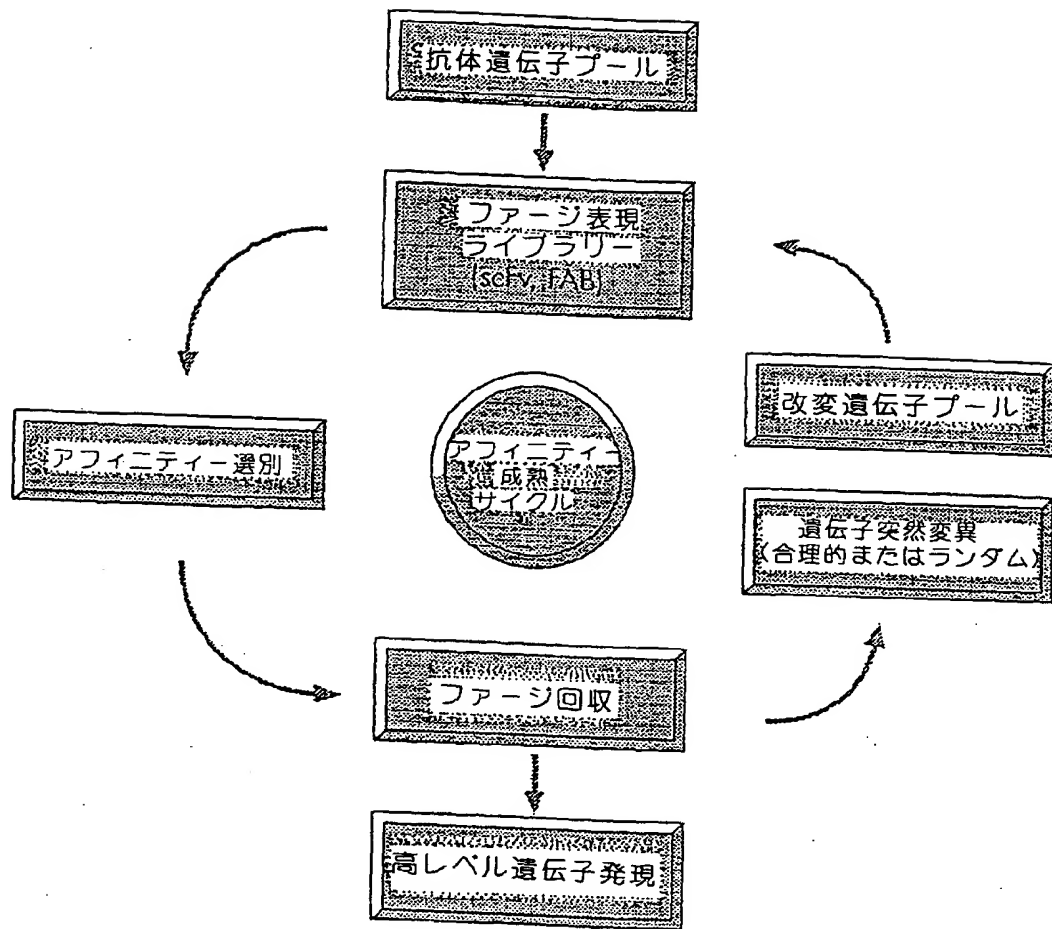


FIGURE 11

【図12】

突然変異 1C3scFv Culture S/Nに対するELISA  
個々のコロニーの選別

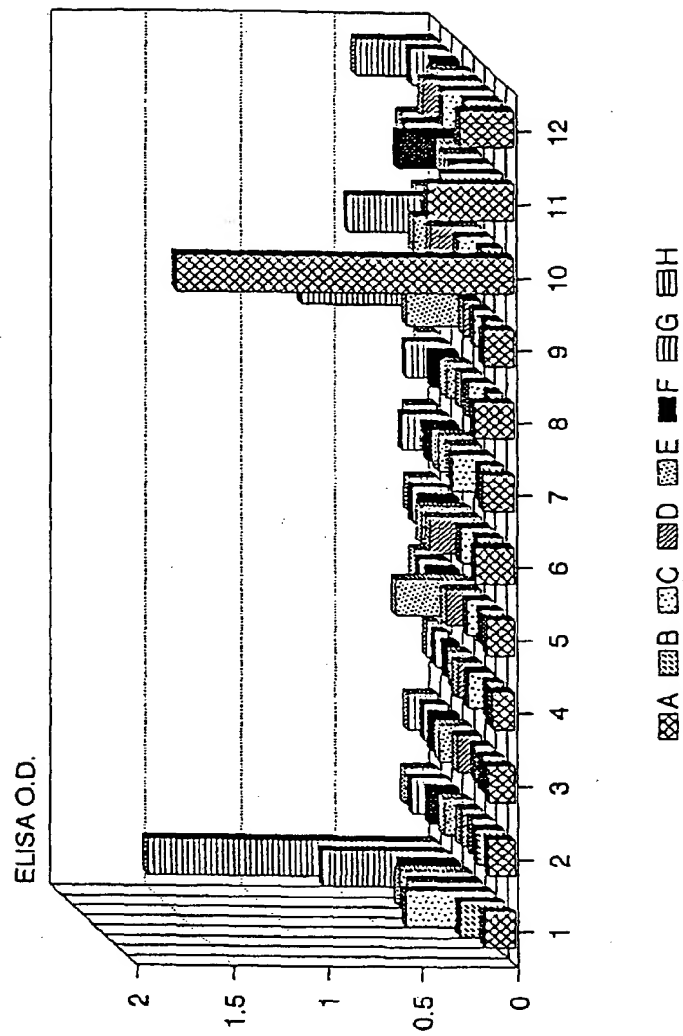


FIGURE 12

【図13】

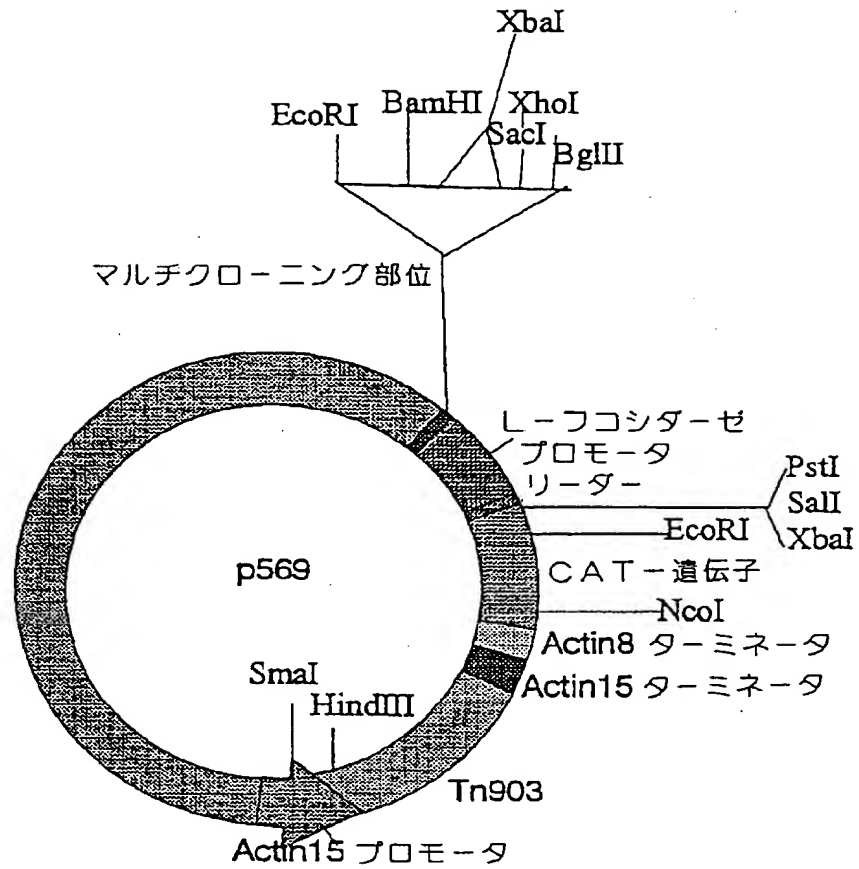
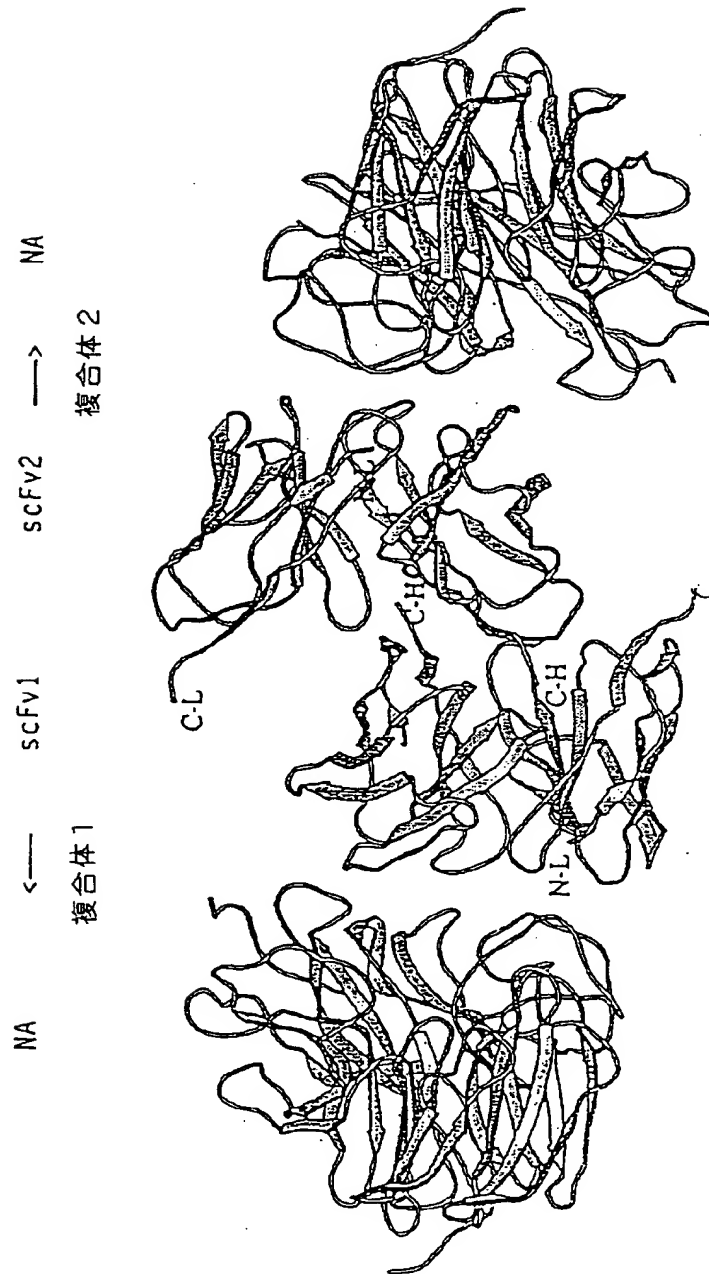


FIGURE 13



FIGURE 14



【図15】

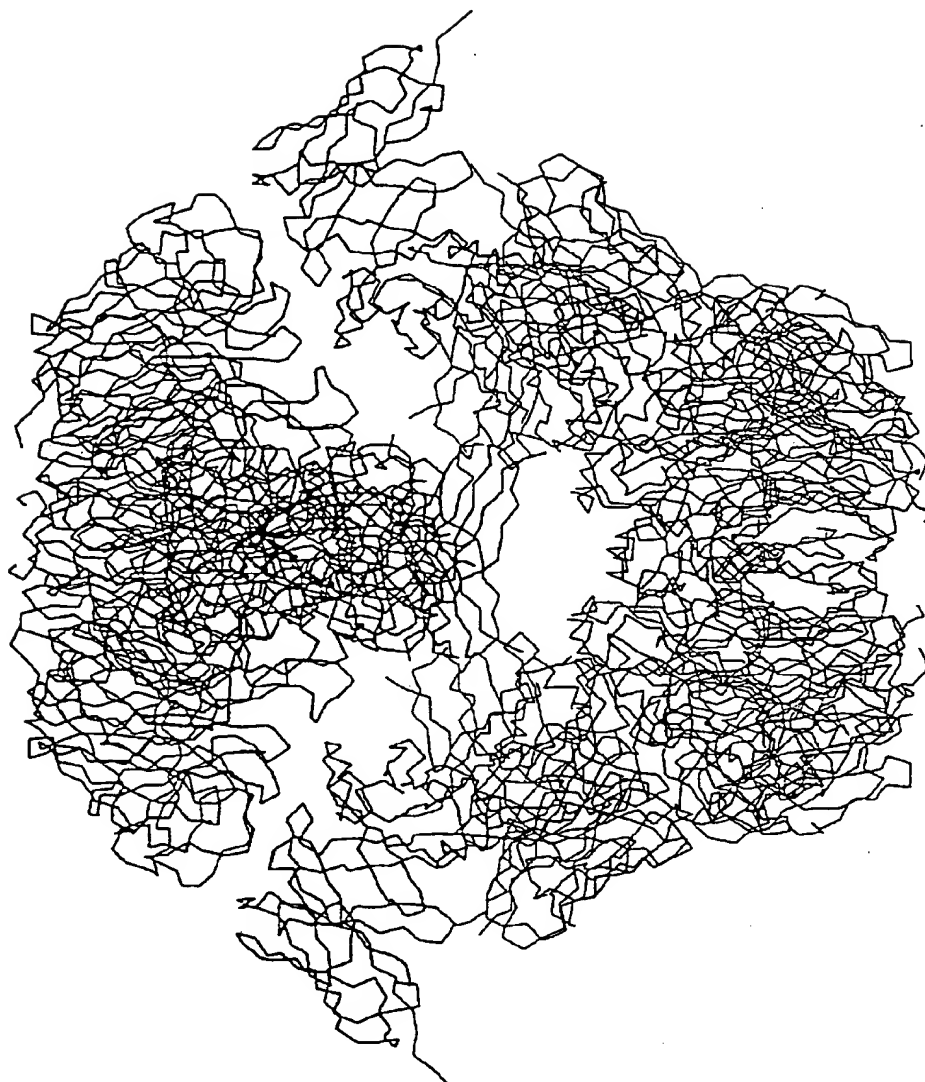
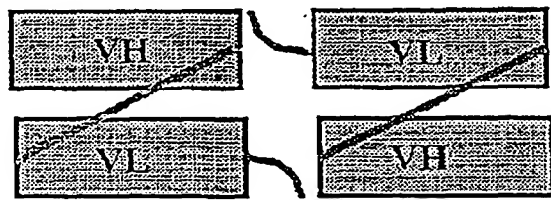


FIGURE 15

FIGURE 16

【図17】

s c F v s 二量体の形成



or

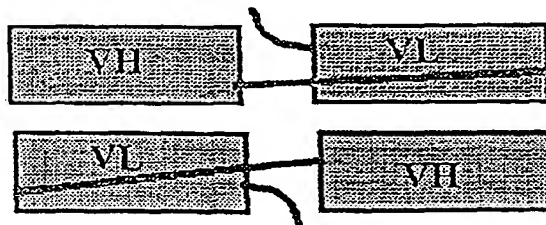


FIGURE 17

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1994年9月21日

【補正内容】

りも高い(約70%;なおIgGは30%)。従って、種々様々な抗原を結合できるように広範な成熟(進化)を予定した抗体ライブラリーを構築するための、理想的な遺伝子材料の供給源を提供する。

【発明の概要】

従って、本発明の範囲内には下記の事項が含まれる。

- 1) 標的に対して結合する新規な組換えポリペプチドの同定および構築。
- 2) このようなポリペプチド剤を、例えばそのDNAコード領域の突然変異を含む機構によって改変し、その性能を変えること。
- 3) 更に、サブコンポーネントの再組合わせにより、遺伝子レベルまたはタンパクレベルの何れかにおいて、これらのポリペプチド剤を変化させること。

第一の側面に従えば、本発明は、標的結合性の組換えポリペプチドであって、

- a) 安定なコアポリペプチド領域(SCR)と、
- b) 少なくとも一つの標的結合領域(TBR)

とを具備し、

前記標的結合領域は、標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを経ているポリペプチドを提供する。

我々は、結合の特異性、親和性または結合活性が改変された本発明によるポリペプチドを、成熟工程の実施を必要とす

結合している4つのscFv分子から構成される。電子顕微鏡によって、2つのノイラミニダーゼ四量体が、四つの二官能性scFv二量体によって緊密に結合している事が確認された(図15)。NC10・MabのscFv構築物との間で複合を形成しているインフルエンザ・ノイラミニダーゼのアジサシN9(鳥類)株について、高解像度の電子顕微鏡観察を行なった。ここで、該分子複合体はホスホタングステン酸カリウム(potassium phospho-tungstate)(pH7.0)、または酢酸ウラニル(pH4.0)によって染色(コントラスト化)した。

同じN9NAの、モノクローナルFab (32/3、NC35およびNC41) との分子複合体および全モノクローナルIgGs (32/3、NC41およびNC10) との分子複合体を画像化した、我々が以前に行なった広範な実験に基づいて、我々は、N9Na-scFv複合体の画像を、4つの架橋scFv二量体によって面と面で結合したノイラミニダーゼの頭部対の閉じた構造であり、この結合は緊密に充填された分子複合体が4重の点対称を維持するように行なわれていると解析することができた(図15)。N9Na-scFv分子複合体のこの画像解析は、溶液中で観察された複合体の分子量、Mr610,000とまさに一致している。

scFvがノイラミニダーゼと複合体を形成している結晶のX線回折(図14)では、二重の回転軸によって関係づけられる二つのscFv分子の間に緊密な会合ある事が実証された。二つの可能な二量体構造が考えられる。最初の例にお

スフェクトされ、YT+AMP+グルコースのプレートに撒かれ、単離された各コロニーはファージ救出に先立って増殖され、「flu」ウイルスまたはグリコホリン上でのELISAによって分析された。ELISA活性のレベルで非野生型の発現したコロニーは、次いで増幅され、DNA配列が決定され、また可溶性の発現のために、該ファージはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手可能な大腸菌HB2151中にトランスフェクトされた。このファージは標準法によってHB2151にトランスフェクトされ、夫々のファージサンプルの選別された個々のコロニーは、YT+AMP (100μg/ml) 中で増殖され、次いで1mMのIPTG (イソプロピルチオガラクトシド) を用いて37℃で4~16時間誘導され、引き続き4℃で16時間任意にインキュベートされた。この培養上清および周辺細胞質抽出物、細胞膜および細胞質を回収し、上記のようにして組換え遺伝子の発現について分析した (Power et al., Gene 1992 113 95-99)。

#### 実施例5

国際出願番号第PCT/AU93/00228に号記載されているようにして調製したファジミドpHFA中の組換えLC3・scFv (グリコホリン結合性抗体コーディング領域) を、実施例4に記載したようにしてmutD大腸菌内でのランダム突

然変異に供し、また選別プロトコールを同様に適用した。但し、この選別には固相マトリックス（ELISAプレート、免疫チューブまたはラテックスビーズ）をグリコホリンAのPBS溶液（ $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ）でコーティングすることが含まれ

#### 請求の範囲

1. 標的結合性の組換えポリペプチドであって、
  - a) 安定なコアポリペプチド領域（SCR）と、
  - b) 少なくとも一つの標的結合領域（TBR）

とを具備し、

前記標的結合領域は、前記SCRに共有結合体に結合しており、また標的に対する特異性、親和性または結合活性を改変するために、任意に成熟プロセスを受けているポリペプチド。

2. 請求項1に記載のポリペプチドであって、自己会合して安定な二量体、凝集体またはアレイを形成することができるポリペプチド。

3. 請求項1または2に記載のポリペプチドであって、前記SCRおよびTBRがリンカー成分によって結合されているポリペプチド。

4. 請求項1～3の何れか1項に記載のポリペプチドであって、二官能性または多官能性であるポリペプチド。

5. 請求項1～4の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記SCRがヒト起源であり、また血清中に存在するか若しくは細胞表面に表現されるタイプのタンパクであるポリペプチド。

6. 請求項1～5の何れか1項に記載のポリペプチドであって、前記TBRが、グリコホリンもしくは他の赤血球細胞表面タンパク、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ、

ウイルス抗原、抗体もしくは他のIgGファミリーのメンバー、腫瘍増殖因子 $\alpha$ （TGF- $\alpha$ ）、腫瘍マーカー、細胞表面タンパクおよび白血病阻害因子（LIF）からなる群から選択される標的に結合することができるポリペプチド。

7. 請求項1～6の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドであって、

修飾抗体もしくは抗体フラグメント、s c F vフラグメント、修飾CD8分子、および抗体分子もしくはそのフラグメントとCD8との組合せを含む、免疫グロブリンスーパーファミリーに対して相同性を有するポリペプチド。

8. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物。

9. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドをコードするDNA構築物を製造する方法であって、標的結合性ポリペプチドコードするDNAを、突然変異および選別の一以上のサイクルに供して、改変された親和性、特異性または結合活性の特性をもった標的結合性ポリペプチドをコードするDNAのサブポピュレーションを得ることを具備した方法。

10. 請求項9に記載の方法であって、標的結合性ポリペプチドをコードする前記DNAが、複製の能力のある要素または表現ベクター内に存在する方法。

11. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターが、バクテリオファージ、繊維状バクテリオファージ、ウイルス、バクテリア、酵母、粘菌、または哺乳類細胞からな

る群から選択される方法。

12. 請求項10に記載の方法であって、前記表現ベクターがpHFAである方法。

13. 請求項12に記載の方法であって、突然変異が大腸菌の突然変異株を用いて行なわれる方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドを製造する方法であって、

- a) 一以上の所望の標的結合性ポリペプチドのフレームワーク構造をコードするDNAを、ポリメラーゼチェーン反応によって単離する工程と、
- b) 該DNAを一以上の表現ベクターに挿入する工程と、
- c) 所望の特異性、結合活性または親和性の標的結合性ポリペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを選別することと、
- d) 改変された親和性、特異性または結合活性の特性を有する標的結合性ポリ



ペプチドを表現する表現ベクターのサブポピュレーションを得るために、前記該選別されたサブポピュレーションを、突然変異誘発および選別の一以上のサイクルに供する工程と、

e) 改変された標的結合性ポリペプチドをコードするDNAを、高レベル発現ベクターに挿入する工程と、

f) 上記の高レベル発現ベクターを適切な発現宿主中に導入する工程と、

g) 前記標的結合性タンパクを発現させる工程と、

h) こうして産生されたタンパクを単離する工程とを具備

した方法。

14. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、薬学的に許容され得る担体とを含有する薬剤組成物。

15. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドと、稀釈剤とを含有する診断試薬。

16. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの診断における使用。

17. 請求項1～7の何れか1項に記載の標的結合性ポリペプチドの医薬としての使用。

【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU 93/00491

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int. Cl. <sup>5</sup> C07K 15/12; C12P 21/08; C12N 15/10; C12N 15/11; C12N 15/12; C12N 15/13 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K 15/12; C07K 15/00; C07K 15/28; C07K 13/00; C12P 21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) File WPAT: Keywords: Influenza virus neuraminidase; transforming growth factor alpha; leukaemia inhibitory factor; CD8 File CASA: Keywords: as above		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X, Y	Lehninger, Albert L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York, 1982. See Chapter 30, pp. 926-933.	1, 2, 8, 9, 14-17
X, Y	Erich, Henry A. (Ed), PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York, 1989. See Part 1, pp. 1-5	14
X	AU, A, 21383/88 (Baylor College of Medicine) 25 January 1990 (25.01.90)	6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 1994 (10.01.94)		Date of mailing of the international search report 13 JAN 1994 (13.01.94)
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN INDUSTRIAL PROPERTY ORGANISATION PO BOX 200 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Facsimile No. (06) 2853929		Authorized officer M. ROSS Telephone No. (06) 2832295

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/AU 93/00491

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X,Y	Callow, Kathleen A., Measurement of Antibodies to Influenza Virus Neurominidase by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Infect. Immun. 41(2) pp. 650-6, 1983	6
X,Y	Chemical Abstracts, Vol. 113, No. 1, issued 1990 (Columbus, Ohio) Sorvillo, John, et al, Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for human transforming growth factor alpha, see the abstract no. 4322f. Oncogene, 5,(3), pp. 377-86, 1990	6
X,Y	AU,A,91229/91 (Immunex Corporation) 8 July 1992 (08.07.92)	1,2,5,6,8,14-17
X,Y	AU,A,79001/91 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc.) 27 November 1991 (27.11.91)	1-6,8-11,14-17
X	AU,B,36143/84 (596070) (The Wistar Institute) 27 June 1985 (27.06.85)	1-6,7,8-11,14-17
X	EP 239400 (Gregory Paul Winter) 30 September 1987 (30.09.87)	7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 Information on patent family members

 International application No.  
**PCT/AU93/00491**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
AU	91229/91	CA	20972/91	EP	561960	FI	932477
		NO	931955	WO	92/10570		
AU	79001/91	BR	9106392	EP	528951	FI	924818
		GB	9009549	HU	9203371	WO	91/16927
AU	36143/84	DE	3479289	DK	3102/85	EP	141783
		EP	291636	US	473123	US	5053224
EP	239400	GB	8607679	GB	8707252	GB	2188638
		JP	62296890	US	5225539		
END OF ANNEX							

## フロントページの続き

- (51) Int. Cl.<sup>6</sup>                      識別記号    庁内整理番号                      F I  
     C 0 7 K    16/10  
               16/18  
               16/28  
               16/30  
               19/00                      8318-4H
- (81) 指定国                      EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN
- (72) 発明者    ラー、マリア  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3071、  
                     ソーンベリー、クラレンドン・ストリート  
                     33
- (72) 発明者    コート、アレックス・アンドリュウ  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3041、  
                     ストレイスマア、アップランド・ロード  
                     23
- (72) 発明者    アービング、ロバート・アレキサンダー  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3170、  
                     マルグレイブ、ハニー    サックル・アベニ  
                     ュー    1
- (72) 発明者    アトウエル、ジョン・レスリー  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3133、  
                     ベルモント・サウス、グレンウエリー・コ  
                     ート    7
- (72) 発明者    マルビー、ロビン・ルイーズ  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3056、  
                     ブランズウィック、パークリー・ストリー  
                     ト    5、ユニット    7
- (72) 発明者    パワー、バーバラ・エレイン  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3111、  
                     ドンペール、キャベナ・ストリート    6
- (72) 発明者    コルマン、ピーター・マルコム  
                     オーストラリア国、ビクトリア州 3122、  
                     ホーゾーン、ホーゾーン・グレン    30エー